

**Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Martin K. Schilling
Doktorvater: Prof. Dr. med. Otto Kollmar**

**Tumordestruktion und Expression von
Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 in kolorektalen Lebermetastasen
nach Kryoablation, Radiofrequenzablation und Laserablation im
Rattenmodell**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012**

**vorgelegt von: Ludwig Walter Waldemar Oberkircher
geboren am: 20.06.1980 in Neunkirchen/Saar**

Dekan: Prof. Dr. med. M.D. Menger

Gutachter 1

2

3

Datum der Promotion:

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Summery	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Kolorektales Karzinom	3
2.2 Kolorektale Lebermetastasen	3
2.3 Therapie kolorektaler Lebermetastasen.....	4
2.4 Kryotherapie (Kryo)	5
2.5 Radiofrequenzablation (RFA).....	5
2.6 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT).....	6
2.7 Matrix Metalloproteinasen (MMP's).....	7
2.8 Aprotinin als MMP-Inhibitor	8
2.9 Eigene Fragestellung	9
3 Material und Methoden.....	10
3.1 Versuchstiere	10
3.2 Tumorzellaufbereitung	10
3.3 Tumorimplantation	11
3.4 Tumorablation	12
3.4.1 Kontrollgruppe	13
3.4.2 Kryoablation (Kryo)	13
3.4.3 Radiofrequenzablation (RFA)	14
2.4.4 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)	14
3.4.5 Aprotinin-Gruppen	14
3.5 Probeentnahme	15
3.6 Versuchsprotokoll.....	16
3.7 Zymographie	17
3.7.1 Probegewinnung für die Zymographie	17
3.7.2 Proteinbestimmung für die Zymographie	18
3.7.3 Gelzusammensetzung für die Zymographie	19
3.7.4 Durchführung der Zymographie	20
3.7.5 Probeauftragung für die Zymographie	21
3.7.6 Liste der verwendeten Substanzen.....	22
3.7.7 Auswertung der Zymographien.....	23

3.8. Histologie	24
3.8.1 Aufbereitung der Proben.....	24
3.8.2 Auswertung der histologischen Schnitte	24
3.9 Statistik	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Anzahl, Gewicht und Überleben der Versuchstiere.....	27
4.2 Qualität und Ausmaß der Tumoren und Größe der Läsionen	27
4.3 Temperaturentwicklung des Lebergewebes während der lokalen Ablation....	28
4.3.1 Temperaturentwicklung während der Kryotherapie	28
4.3.2 Temperaturentwicklung während der RFA	30
4.3.3 Temperaturentwicklung während der LITT	31
4.4 Histomorphologische Auswertung.....	32
4.4.1 Leberläppchen- und Azinusstruktur nach lokaler Tumorablation (Thema a)	33
4.4.2 Destruktion der intralobuläre Balkenstruktur nach lokaler Tumorablation (Thema b)	35
4.4.3 Vorhandensein von intralobulären Zellfragmenten nach lokaler Tumorablation (Thema c)	36
4.4.4 Ausmaß der Einblutung nach lokaler Tumorablation (Thema d).....	37
4.4.5 Intaktheit der Hepatozyten nach lokaler Tumorablation (Thema e)	39
4.4.6 Anteil an pyknotischen / schwarzen Zellkernen nach lokaler Tumorablation (Thema f)	40
4.4.7 Abgrenzung der Ablationsrandzone zum Normalgewebe nach lokaler Tumorablation (Thema k)	41
4.4.8 Anzahl von thrombosierte Gefäßen nach lokaler Tumorablation (Thema Gefäß a)	42
4.4.9 Anzahl von intravaskulären Fibrinthromben nach lokaler Tumorablation (Thema Gefäß b)	43
4.5 Latente und aktive MMP-2- und MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation (Zymographien).....	44
4.5.1 Latente MMP-2-Expression nach lokaler Tumorablation	44
4.5.2 Aktive MMP-2-Expression nach lokaler Tumorablation	46
4.5.3 Latente MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation	48
4.5.4 Aktive MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation	50

4.5.4	MMP-Expression nach Inhibition durch Aprotiningabe und lokaler Tumorablation.....	52
5	Diskussion	55
5.1	Methoden der tierexperimentellen Tumorablation in der Leber	55
5.2	Methode der Zymographie zur MMP-Bestimmung.....	56
5.3	Ausmaß und Qualität der Gewebedestruktion durch Kryo, RFA und LITT	57
5.4	Einfluss von Kryo, RFA und LITT auf die MMP-2- und MMP-9-Expression nach Tumorablation in der Leber	60
5.5	Auswirkung der MMP-Inhibition durch Aprotinin auf die MMP-2- und MMP-9-Expression nach Tumorablation in der Leber	63
5.6	Schlussfolgerung.....	64
6	Literaturnachweise	65
7	Publikationen.....	80
8	Danksagung	83
9	Lebenslauf.....	84

1.1 Zusammenfassung

Mit einer Inzidenz von ca. 1 Million ist das kolorektale Karzinom die weltweit dritthäufigste maligne Tumorerkrankung. Rund 25-30% der Patienten mit neu diagnostiziertem kolorektalem Karzinom entwickeln innerhalb von 2-3 Jahren hepatische Metastasierungen. Neben der chirurgischen Resektion wurden in den letzten Jahren zusätzlich lokal ablative Verfahren wie die Kryotherapie, die Radiofrequenzablation und die Laserinduzierte Thermotherapie zur Therapie von nicht resektablen Tumoren entwickelt. In Zusammenhang mit diesen Ablationsverfahren konnte jedoch eine erhöhte Rezidivrate festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP's) (v.a. MMP-2 und MMP-9) im kolorektalen Karzinom und in kolorektalen Lebermetastasen vorliegt und zu einer erhöhten Rezidivrate führt. Auch ein Zusammenhang zwischen ablativen Verfahren und vermehrter MMP-2- und MMP-9-Expression konnte gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit untersucht in einem etablierten Rattenmodell die Expression von MMP-2 und MMP-9 in unbehandelten kolorektalen Tumorzellen im Gegensatz zum normalen Lebergewebe und nach Behandlung mittels der drei oben genannten Ablationsverfahren und vergleicht diese hinsichtlich ihrer Tumordestruktion und Auswirkung auf die Expression von MMP-2 und MMP-9. Zusätzlich wird untersucht, ob die Verwendung eines MMP-Inhibitors eine erhöhte MMP-Expression nach Ablation verhindert. In der histologischen Untersuchung zeigte sich, dass alle Verfahren zu einer adäquaten Tumordestruktion führten. Weiterhin konnte in der Zymographie eine erhöhte MMP-2- und MMP-9-Expression in den kolorektalen Karzinomzellen gegenüber dem normalen Lebergewebe nachgewiesen werden. Innerhalb der Ablationsgruppen führte vor allem die Kryotherapie zu einer erhöhten MMP-2- und MMP-9-Expression im Tumorgewebe sowie im Randgebiet der Ablation. Eine wesentliche Reduktion der MMP-Expression nach Ablation konnte durch die Verwendung des unspezifischen MMP-Inhibitors Aprotinin nicht nachgewiesen werden.

1.2 Summery

With an incidence of approximately 1 million colorectal cancer is the third most common malignancy worldwide. Approximately 25-30% of patients with newly diagnosed colorectal carcinoma develop within 2-3 years hepatic metastases. In addition to the surgical resection in recent years local ablative techniques such as cryotherapy, radiofrequency ablation and laser-induced thermotherapy for the treatment of non-resectable tumors were developed. In connection with these treatments, however, an increased rate of recurrence was observed. Furthermore, it was shown that increased expression of matrix metalloproteinases (MMP's) (MMP-2 and MMP-9 above) in colorectal carcinoma and colorectal liver metastases is present and leads to an increased relapse rate. Also a correlation between increased MMP-2 and MMP-9 expression and ablative procedures was demonstrated. The present study examined in an established rat model the expression of MMP-2 and MMP-9 in untreated colorectal tumor cells in contrast to normal liver tissue and in tumor cells after treatment using the above three ablation and compares them in terms of tumor destruction and impact on the expression of MMP-2 and MMP-9. In addition were investigated whether the use of an MMP inhibitor prevented increased MMP expression after ablation.

In the histological examination showed that all procedures have led to adequate tumor destruction. Furthermore, in the zymography an increased MMP-2 and MMP-9 expression was detected in the colorectal carcinoma cells compared to normal liver tissue. Especially within the ablation, cryotherapy resulted in increased MMP-2 and MMP-9 expression in tumor tissue and in the outskirts of the ablation. A significant reduction of MMP-Expression after ablation could not be detected by the use of non-specific MMP-inhibitor Aprotinin.

2 Einleitung

2.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist weltweit die dritthäufigste maligne Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1 Million [1;53;100;146]. Mit über 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland stellt das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Ursache aller Krebstodesfälle bei Männern und Frauen dar [109]. Vor allem Menschen im fortgeschrittenen Alter sind betroffen. 93% aller Fälle werden bei Patienten über 50 Jahren diagnostiziert, die Hälfte davon ist älter als 70 Jahre [100]. Als Risikofaktoren werden fett- und cholesterinreiche Kost, entzündliche Darmerkrankungen (Colitis Ulcerosa), kolorektale Adenome und genetische Dispositionen, wie z.B. HNPCC und FAP, angesehen [6].

Die Metastasierung erfolgt meist zuerst lymphogen in die regionalen Lymphknoten und danach hämatogen in Leber und Lunge, danach erst in andere Organe.

2.2 Kolorektale Lebermetastasen

Bei Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms weisen rund 25-35% der Patienten schon synchrone Lebermetastasen auf [33;83], 25-30% der Patienten entwickeln hepatische Metastasierungen innerhalb von 2-3 Jahre [68;149]. Die Prognose der Erkrankung wird hauptsächlich durch das Vorhandensein oder das Fortschreiten der sekundären Lebererkrankung und nicht durch das primäre Karzinom bestimmt. Die Lebenserwartung bei Lebermetastasen ohne Behandlung liegt bei unter 1 Jahr, die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 10% [40;82;140;144].

In Obduktionsstudien zeigten sich bei 50% aller Patienten, die aufgrund eines kolorektalen Karzinoms verstarben, Lebermetastasen, die in der Mehrzahl der Verstorbenen die Todesursache darstellte [6]. Aus dem Überschreiten der Tumorlast in der Leber und dem Befall von wichtigen hepatischen Versorgungsstrukturen folgt in der Regel ein letales Organversagen. Somit ist neben der Verbesserung der Früherkennung und der Nachsorge kolorektaler Lebermetastasen auch die Planung einer patientenschonenden Therapie mit maximaler Effektivität von Bedeutung [139].

2.3 Therapie kolorektaler Lebermetastasen

Unter kurativer Zielsetzung stellt bislang einzig die chirurgische Resektion die Methode der Wahl bei kolorektalen Lebermetastasen dar. Kontraindikationen sind z.B. extrahepatische Begleiterkrankungen und Metastasen, anatomische Lage des Tumors, Leberinsuffizienz und vier oder mehr Tumore [34;138]. Die postoperative Mortalität beträgt dabei unter 5% [4;17;36;37;46;52;57;85;93;118], besonders in medizinischen Zentren, in denen das intraoperative Blutungsrisiko vermindert und intraoperativ Ultraschall eingesetzt werden kann. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 25-48% [4;17;36;37;45;46;52;55;57;81;85;93;117;118;149]. Bei nur ca. 17-25% der Patienten kann die Behandlung als kurativ angesehen werden [20;38;46;118]. Bei Patienten mit Resektion bilobulärer Metastasen wird sogar die erneute Resektionsnotwendigkeit mit 75-90 % angegeben [5;42;51].

In den letzten Jahren wurden einige zusätzliche Verfahren entwickelt, wie z.B. die neoadjuvante Chemotherapie und die präoperative Pfortaderembolisation, um den Anteil der Patienten, die für eine potentielle kurative Behandlung infrage kommen, zu erhöhen [2]. Trotz dieser multimodalen Therapieansätze ist immer noch die Mehrheit der Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen nicht für eine komplette chirurgische Resektion geeignet.

Bei gleichzeitiger Resektion des primären kolorektalen Karzinoms und der Lebermetastasen zeigt sich eine höhere Komplikationsrate, sodass die Leberresektion erst 2-3 Monate später erfolgen sollte [106]. Bei inoperablen Lebermetastasen stehen als Behandlungsoptionen sowohl die Chemotherapie als auch Ablationsverfahren zur Verfügung. Da bei der Chemotherapie zwar temporär Lebermetastasen verkleinert bzw. bei kleinen Herden auch vollständig zerstört werden, aber bei größeren Metastasen meist keine vollständige Entfernung gelingt, könnten sich ablativ Verfahren als vorteilhaft erweisen [139]. Diese Verfahren können perkutan, laparoskopisch oder intraoperativ durchgeführt sowie mit Chemotherapie bzw. chirurgischer Resektion kombiniert werden. Im Folgenden werden drei dieser Verfahren vorgestellt, die klinisch angewendet werden.

2.4 Kryotherapie (Kryo)

Von allen hier dargestellten Ablationsverfahren ist die Kryotherapie das älteste. Sie wurde 1963 vorgestellt. Hierbei kommt es mittels Gefrieren bis zum absoluten Nullpunkt (-168°C) und Auftauen durch Flüssigstickstoff oder Argongas [101] zu einer Kolliquationsnekrose und das definierte Gewebe wird destruiert. Die Mortalitätsrate liegt dabei bei ca. 0%-8% mit einer Gesamtmortalität von 1,6%. Die mittlere Überlebensrate liegt derzeit bei 8 bis 43 Monaten [71]. In der Studie von Onik et al. 1991 wurden 69 Patienten mit Lebermetastasen behandelt, von denen nach 12-15 Monaten 60% überlebt haben und 40% als geheilt angesehen wurden [95]. In einer anderen Studie von Ravikumar et al. mit 32 Patienten, davon 24 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, wurde bei 28% innerhalb von 24 Monaten kein Rezidiv beobachtet [108]. Weaver et al. berichtet über 47 Patienten, bei denen nach 26 Monaten allerdings eine Rezidivrate von 38% zu verzeichnen war [145].

In den letzten Jahren haben klinische Studien bestätigt, dass die Kryotherapie eine sichere und effektive Behandlung für Patienten mit inoperablen Lebermetastasen darstellt. Dabei wurden viel versprechende Überlebensraten dokumentiert [116;125]. Trotzdem scheint diese Methode mit einer erhöhten Rezidivquote einherzugehen. Diese liegt nach Behandlung der kolorektalen Lebermetastasen mittels Kryoablation bei 16-44% [15;47;54;74;122-124].

2.5 Radiofrequenzablation (RFA)

In den späten Achtzigern modifizierten zwei wissenschaftliche Gruppen die Technik der Radiofrequenzablation um fokale, thermische Verletzungen im Leberparenchym hervorzurufen. Histologisch zeigte sich dabei eine fokale thermale Läsion, die mit einer gut definierten konzentrischen Koagulationsnekrose einherging [79;114].

Die hyperthermale Läsion wird durch zwei Phasen hervorgerufen. Die erste Phase besteht aus der direkten Hitzeeinwirkung und führt zur sofortigen Destruktion des Gewebes, die zweite Phase resultiert aus einem indirekten Gewebsschaden, der sich erst nach der Ablation einstellt [90]. Weiterhin hofft man, nicht nur den Tumor zu zerstören, sondern auch den Randbereich [2;96;128;129].

Zur Zeit ist die Radiofrequenzablation das am meisten akzeptierte ablativ Verfahren [136].

Solbiati et al. berichten 2001 über Ergebnisse der ultraschallgesteuerten Ablation von 117 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen. Die 3-Jahresüberlebensrate betrug dabei 46%, wobei allerdings die Remetastasierungsrate bei 57% lag [131]. Gilliams u. Lees erzielten bei 69 Patienten eine Dreijahresüberlebensrate von 34% [43].

Lencioni et al. veröffentlichte 2004 eine Studie mit 423 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen. Die 3-Jahresüberlebensrate lag hier bei 47% und die 5-Jahresüberlebensrate bei 24% [65]. Abdalla et al. zeigten, dass selbst bei erfahrenen Operateuren das lokale Rezidivrisiko signifikant höher ist als nach einer Resektion [2]. Schiffman et al. untersuchten 2010 retrospektiv 140 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, von denen 95 Patienten mit einer Leberresektion und 45 Patienten mittels Radiofrequenzablation behandelt wurden. Die Rezidivrate nach Ablation war in der hier genannten Studie signifikant höher als nach Resektion [119]. In den bisher veröffentlichten Studien variiert die lokale Rezidivquote zwischen 5 und 34% [21;24;27;31;50;66;73;97;102;113;130]. In einer Arbeit von McKay et al. findet sich sogar eine Rezidivrate von 60% in den ersten 46 Monaten nach Radiofrequenzablation [80].

2.6 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)

Bei der laserinduzierten Thermotherapie (LITT) wird über eine oder mehrere optische Fasern gleichmäßig Laserstrahlenenergie in das Zielgewebe geführt. Die LITT basiert prinzipiell auf der Methodik der Hyperthermie, die noch um den koagulativen Effekt ergänzt wird. Somit kommt es zur erwünschten Denaturierung der Proteine [139].

Vogl et al. veröffentlichten eine Studie mit insgesamt 603 Patienten mit Lebermetastasen, von denen 368 Patienten an kolorektalen Lebermetastasen erkrankt waren. Die kumulative Überlebensrate lag bei 47,7 Monaten, wobei die mittlere Überlebensrate bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen 42,7 Monate betrug [139]. Die Dreijahresüberlebensrate lag bei 56%, die Fünfjahresüberlebensrate bei 37%.

Christophi et al. zeigten in ihrer Studie von 2004 eine 3-Jahresüberlebensrate ohne Tumorrezidiv von 19,3% und eine 5-Jahresüberlebensrate ohne Rezidiv bei nur 3,8% aller Patienten. Die allgemeine 3-Jahresüberlebensrate lag bei 48,3%, die 5-Jahreüberlebensrate bei 6,7% [18]. Über Langzeitergebnisse und Rezidivrisiken bei Laserablation lassen sich zurzeit nur wenige Studien finden. Bei den bisher veröffentlichten Arbeiten variiert die Rate der aufgetretenen lokalen Rezidive zwischen 5 und 50 % [92;135;139].

2.7 Matrix Metalloproteinasen (MMP's)

Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) sind zinkabhängige Endopeptidasen, die einen wesentlichen Anteil am Abbau extrazellulärer Matrix beim Metastasierungsvorgang haben. Insgesamt wurden bis heute mehr als 20 Formen der MMP's identifiziert, die in folgende Subtypen unterteilt werden: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, „membrane-type“ und nicht klassifizierte MMP's [88;98;143].

In normalem Gewebe ist eine MMP-Expression nur gering oder gar nicht nachweisbar, während bereits viele Studien eine erhöhte MMP-Expression in den meisten malignen Tumoren, wie z. B. Lungen-, Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinomen nachgewiesen haben [48]. Durch ihre Eigenschaft als Destruktoren der Extrazellulären Matrix (ECM) spielen sie eine wesentliche Rolle bei der Tumordinvasion, Angiogenese und Metastasierung kolorektaler Karzinome. Dabei werden enzymatisch neben der ECM auch die Basalmembran und das intestinale Stroma degradiert. Trotz dem Beitrag vieler verschiedener Proteasen kommt den MMP's bei der Matrixdegradation die tragende Rolle zu, da sie gemeinsam sämtliche Komponenten des Bindegewebes destruieren können. Insbesondere die Gelatinasen MMP2 und MMP9 tragen hauptsächlich zur Metastasierung bei, da beide Proteinase Typ-IV-Kollagen, die Hauptkomponente der Basalmembran, spalten [88;112]. Eine große Anzahl normaler und transformierter Zellen exprimieren MMP-2. Dieses spaltet wie auch MMP-9 u.a. Gelatine, Laminin und Nidogen [112]. Zur Unterscheidung zu anderen MMP's trägt das Vorhandensein einer fibronectintype II – Domäne bei, die eine Verbesserung der Substratbindung bewirken soll [7]. MMP-9 ermöglicht durch Degradierung von Komponenten der Basalmembran und Extrazellulärmatrix die Migration verschiedenster Zellen (z.B. Leukozyten, aber auch

Tumorzellen) [112]. Neben Keratinozyten, Monozyten, Alveolarmakrophagen und Leukozyten wird MMP-9 auch von Tumorzellen exprimiert [147]. Diese induzieren weiterhin in den angrenzenden Mesenchymzellen eine vermehrte MMP-9 Produktion, um diese während ihrer Metastasierung und Invasion zur Migration zu verwenden [49;111]. MMP-9 ist darüber hinaus bei der Gestaltung neuer Blutgefäße beim Wachstum des Tumors beteiligt [13].

Die MMP mRNA Expression und die MMP Immunreaktivität spiegeln nicht die aktuelle Proteaseaktivität wieder [142]. Die Zymographie eignet sich allerdings hervorragend zur Darstellung der latenten und aktivierten Form, so dass diese Methode auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Schon Liabakk et al. [70] 1996 und 1998 Parsons et al. [99] zeigten eine sehr hohe Korrelation von aktivierter MMP2 zum malignen Phänotyp beim kolorektalen Karzinom. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte MMP-9 Expression bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe zu einer deutlich erhöhten Rezidivrate nach den ersten 30 Monaten führte [3]. Waas et al. konnten mittels Zymographie eine erhöhte Expression an aktivierter MMP-2 und MMP-9 im kolorektalen Karzinom sowie in kolorektalen Lebermetastasen nachweisen [141;142]. Die Studie von Frich et al. zeigten schließlich sogar eine signifikante Steigerung der MMP-2 und -9-Aktivität nach Radiofrequenzablation [39]. Shan Ke et al. konnten 2010 im Tierversuch zeigen, dass überlebende Tumorzellen nach insuffizienter Radiofrequenzablation unter anderem MMP-9 überexprimieren und es so möglicherweise zu einer rapiden Progression der verbliebenen Tumorzellen kommt

2.8 Aprotinin als MMP-Inhibitor

Aprotinin wurde in den 1960er Jahren von der Firma Bayer (Leverkusen, Deutschland) zur Verminderung des Blutverlustes bei größeren Operationen entwickelt. In der Eigenschaft als Serine Protease Inhibitor hemmt Aprotinin Plasmin, Trypsin, Kallikrein und Chymotrypsin und reguliert die Konzentrationen und Aktivitäten von MMP's.

2.9 Eigene Fragestellung

Die bereits beschriebenen ablativen Verfahren bieten eine aussichtsreiche Alternative für Patienten mit inoperablen kolorektalen Lebermetastasen. Die gezeigten Rezidivraten von teils über 50% sind allerdings bisher nicht eindeutig erklärt. Somit stellt sich diese Arbeit folgende Fragen:

- Wie zeigt sich histologisch die Tumordestruktion durch Kryo-, RFA und LITT und lassen sich Unterschiede erkennen?
- Wie hoch ist die Expression von MMP-2 und 9 in kolorektalen Tumorzellen im Vergleich zum normalen Lebergewebe?
- Ist nach Ablation mittels aller genannten Verfahren eine erhöhte Expression der MMP-2 und 9 im Gewebe zu erkennen?
- Unterscheiden sich dahin gehend die verschiedenen Ablationsverfahren?
- Lässt sich eine erhöhte MMP-Expression nach Ablation durch die Verwendung von MMP-Inhibitoren (z.B. Aprotinin) verhindern?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihe wurden weibliche Wistar-Albino-Glaxo(Wag)-Rij-Ratten verwendet, die ein durchschnittliches Gewicht von ca. 200g hatten. Diese wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Leitung Prof. Dr. M.D. Menger) bei 22-24 °C und 40-50% Luftfeuchtigkeit in Käfigen zu 2 bis maximal 6 Tieren gehalten. Die Tierversuche sowie die Tierhaltung wurden entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Landratsamt des Saarpfalzkreises, Homburg/Saar) durchgeführt.

Da in vielen Studien und im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie das isolierte Tumorstadium der Tumorzelllinie CC531 in Wag-Rij-Ratten ein etabliertes Verfahren darstellt, konnte somit ein isoliertes Wachstum kolorektaler Lebermetastasen in der Ratte simuliert werden.

Durch dieses Verfahren besteht die Möglichkeit, kontrollierte kolorektale Lebermetastasen zu erzeugen, die anschließend punktuell mittels ablativer Verfahren behandelt werden können.

3.2 Tumorzellaufbereitung

Zelldaten:

Cell Lines Service and Tumor-Cellbank (Heidelberg, Deutschland)

Organismus: Syngeneic WAG-Rij-Ratten

Gewebe: Colon-CA

Freeze-Medium: CM-1, Cell Line Service

Kultur-Medium: RPMI 1640 Medium, 80%; fetal bovine serum, 20%

Die Zellen des CC531 Kolonkarzinoms der Ratte wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium (RPMI 1640 with L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 20% FCS-Lösung (Foetal Bovine Serum Gold; PAA) und Pen/Strep (100U/ml Penicillin/ 0,1mg/ml Streptomycin; PAA) kultiviert.

Zur Aufbereitung für die Implantation mussten die Zellen aufgrund ihres adhärenen Wachstums zunächst mit 0,5%Trypsin/ 0,02%EDTA (PAA) vom Boden der Kulturschale abgelöst werden.

Nun wurden diese abgelösten Zellen mit 10ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen (50ml Centrifuge Tube; Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und anschließend mit 550xg (550G) genau 3min lang zentrifugiert. Nach anschließendem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet aufgerüttelt und erneut mit RPMI+ 20% FCS+ Pen/Strep zentrifugiert. Hierdurch konnte das Trypsin ausgewaschen werden. Anschließend wurde das Zellpellet in Medium gelöst und in einer Neubauer-Zählkammer die absolute Zellzahl bestimmt.

Es erfolgte anschließend ein erneutes Zentrifugieren der Zellen in PBS (PAA Laboratories) mit 550xg 3min lang. Danach wurde der Überstand abpipetiert und mit RPMI aufgefüllt, so dass eine Konzentration von 250.000 Zellen/ μ l erreicht wurde. Von diesem Gemisch wurden 40 μ l in eine Einmal-Feindosierungsspritze (Omnican[®]F; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgezogen, die somit ca. 1×10^7 Zellen enthielt.

3.3 Tumorimplantation

Zunächst erfolgten eine Anästhesie der Ratte mit Äther und das Bestimmen des Körpergewichtes. Anschließend wurde intraperitoneal Ketamin in einer Dosis von 81mg/kg KG (Ketavet[®]; Pharmacia, Erlangen, Deutschland) und Xylazin in einer Dosis von 3,8mg/kg KG (Rompun[®] 2%; Bayer Vital GmbH, Leverkusen) gegeben. Danach wurde Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) auf die Augen aufgetragen und der Bauch rasiert.

Es erfolgte eine mediane Laparotomie mit Schnittführung von Nabel bis Xyphoid. Mittels zweier Klemmen wurde das Abdomen offen gehalten, ohne dabei die Atmung des Tieres zu unterdrücken. Durch diese bereits etablierte Methode konnte eine isolierte kolorektale Lebermetastase im linken Leberlappen induziert werden [59;62]. Der linke Leberlappen wurde freipräpariert und auf eine feuchte Kompresse gelagert. Nun konnte mit der oben beschriebenen Mikroliterspritze in den Rand der Leber eingestochen und die Kanüle subkapsulär eingeführt werden. Dabei musste stets darauf geachtet werden, dass die Kanüle vorsichtig vorgeschoben wurde und die

Kanülenöffnung zu jeder Zeit sichtbar war, um nicht vor dem Zielort schon Tumorzellen zu applizieren.

Nach ca. 10 mm wurden die 40µl langsam über mindestens zwei Minuten injiziert, während stets ein scharf begrenzter weißer Fleck über der Kanülenöffnung zu sehen sein musste. Danach wurde die Kanüle vorsichtig zurückgezogen und entfernt, die Einstichstelle wurde mittels einem kleinen Tropfen Gewebekleber Enbucrilat (Histoacryl[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen, um einen Zellenaustritt über den Stichkanal in den Peritonealraum zu verhindern.

Der mobilisierte Leberlappen wurde vorsichtig zurückverlegt und der Bauchraum ausgiebig mit NaCl 0,9% (Ecotainer[®]; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespült, um Verwachsungen vorzubeugen. Die Bauchwand wurde durch fortlaufende Naht (Prolene[®] 3/0 SH-Nadel; Ethicon, Brüssel, Belgien) verschlossen und vor dem Knoten nochmals eine einmalige Gabe von 10 ml NaCl 0,9% intraperitoneal gegeben.

3.4 Tumorablation

Vierzehn Tage nach Tumorimplantation erfolgte die zweite Operation. Erneut wurde die Anästhesie der Ratte mittels Äther eingeleitet, anschließend das Körpergewicht ermittelt und intraperitoneal Pentobarbital-Natrium, 53,33 mg/kg KG (Narkoren[®]; Merial, Hallbergmoos, Deutschland) gegeben.

Die Ratte wurde auf dem Rücken gelagert und erneut der Bauch sowie der Hals rasiert. Zur Verbesserung der Atemsituation erfolgte eine Tracheotomie, indem ein medianer Schnitt am Hals und ein Freipräparieren der Trachea durchgeführt wurden. Diese konnte vorsichtig unter Schonung der nahe liegenden Gefäße eingeschnitten werden, worauf ein Polyethylen Katheter ID 1,67mm (Portex[®]; Smiths Medical, Hythe, United Kingdom) eingeführt und mittels einer zuvor gelegten Schlinge befestigt wurde.

Es erfolgte eine erneute mediane Laparotomie entlang der alten OP-Narbe und in V-förmiger Erweiterung von der Symphyse bis zum Rippenbogen beidseits. Anschließend wurde das Abdomen nach kranial aufgespannt und alle Ligamente mittels einer Mikroschere durchtrennt. Die Leber wurde dabei höchstens mit einem angefeuchteten Stabtupfer berührt und ggf. von Verwachsungen freipräpariert.

Der linke Leberlappen konnte nun erneut auf eine feuchte Kompresse gelegt werden, so dass der gewachsene Tumor deutlich sichtbar war. Bei allen Verfahren wurden Temperaturmesssonden (Durchmesser 400µm) des Thermometers ERBE ET 1 (ERBE, Tübingen, Deutschland) im Abstand von 5 und 10mm vom jeweiligen Therapiesondenrand ins Lebergewebe eingebracht. Nach der Ablation wurden die Sonden entfernt und die Läsionen vermessen. Je nach Gruppe wurde nun bis zur Probeentnahme eine Stunde, bzw. 3 Stunden oder 6 Stunden gewartet. In dieser Zeit lagen die Versuchstiere auf temperierten Platten, und es wurde auf eine Narkoseerhaltung geachtet. Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurden die Gewebeproben entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren bzw. in Formalin eingelegt.

Zur Verdeutlichung sind die verschiedenen Verfahren nochmals einzeln aufgezählt.

3.4.1 Kontrollgruppe

Bei den Tieren der Kontrolle erfolgte keine Behandlung. Der Tumor wurde vermessen und anschließend direkt die Proben, wie unten aufgeführt, entnommen.

3.4.2 Kryoablation (Kryo)

Zunächst erfolgte das Aufsetzen der Sonde (Durchmesser 3,2 mm) des Ablationsgerätes CRYO 6 (ERBE, Tübingen, Deutschland) direkt auf das Zentrum des Tumors. Die Therapie wurde gestartet und mittels der Sonde wurde der Tumor und das umgebende Gewebe auf -168°C herabgefroren und diese Temperatur anschließend für 30 Sekunden gehalten. Mit Hilfe der bereits oben beschriebenen Temperatursonde wurden gleichzeitig die Temperaturen auf der Leberoberfläche 5 mm und 10 mm von der Kryosonde entfernt gemessen. Zunächst erfolgte das passive Auftauen auf -30°C an der Sondenspitze, danach das erneute Frieren auf -168°C und Halten der Temperatur für weitere 30 Sekunden. Anschließend wurde die Behandlung durch erneutes passives Auftauen beendet. Die Temperaturen im Therapiebereich und auf der Leberoberfläche wurden weiter alle 5 Minuten festgehalten, nach insgesamt 12 min. wurde die Messung abgeschlossen.

3.4.3 Radiofrequenzablation (RFA)

Der Applikator (Radionics HF-Elektroden-Kit Cool-tip™) wurde vor Beginn der Therapie genau ins Zentrum des Tumors eingeführt. Zunächst wurde die Temperatur im Mittelpunkt, bei 5mm Abstand und bei 10mm Abstand sowie der Widerstand gemessen. Eine am Applikator angeschlossene Pumpe wurde in Gang gesetzt, die während der Behandlung die Applikatorspitze mittels NaCl 0,9% (Ecotainer®, B. Braun) kühlte. Die Ablation wurde mit dem Radionic™ Cool-tip RF-System Tip (tyco healthcare, Boulder, CO, USA) durchgeführt. Die Therapiedauer betrug 3 Minuten, die applizierte Leistung 7 Watt. Jede halbe Minute wurden die jeweiligen Temperaturen festgehalten, der Widerstand und die Stromstärke nach einer Minute.

2.4.4 Laserinduzierte Thermotherapie (LITT)

Die Lasersonde wurde möglichst genau mittig in den Tumor eingelegt und an einem Stativ fixiert. Anschließend erfolgte die genaue Einstellung der Watt-Zahl (4 Watt). Die oben beschriebenen Temperatursonden wurden bei einem Abstand von 5mm und 10mm am Gewebe angebracht. Danach erfolgte das Starten der Therapie. Während der Ablation wurden die Temperaturen an den oben angegebenen Stellen jede Minute gemessen. Die Behandlung wurde nach 5 Minuten beendet. Es erfolgten weitere Temperaturmessungen bis zu einer Gesamtdauer von 10 Minuten. Danach erfolgten das Entfernen der Sonde und die Vermessung der Läsion.

3.4.5 Aprotinin-Gruppen

Die jeweiligen Behandlungen der Aprotinin-Gruppen entsprachen den oben genannten Bedingungen. Unmittelbar vor jeder Behandlung wurde die Vena cava präpariert und mittels Insulinspritze 50000 KIE (Kallikrein-Inhibitor-Einheit) Aprotinin (Trasylo®l®, Bayer, Deutschland) langsam infundiert.

3.5 Probeentnahme

Die Probeentnahme erfolgte an drei unterschiedlichen Gewebestellen (siehe Abb. 1). Zunächst wurde eine Probe aus dem direkten Ablationszentrum exzidiert, danach aus dem Ablationsrand und schließlich aus dem rechten Leberlappen eine Gewebeprobe des unbehandelten Leberparenchyms. Unmittelbar nach Entnahme erfolgte die Konservierung eines Teiles in Formalin zur histomorphologischen Untersuchung und das Einfrieren des restlichen Gewebes in flüssigem Stickstoff zur späteren Proteinbestimmung und Zymographie.

Die so schockgefrorenen Gewebstücke wurden schnellstmöglich in -80°C tiefgefroren.

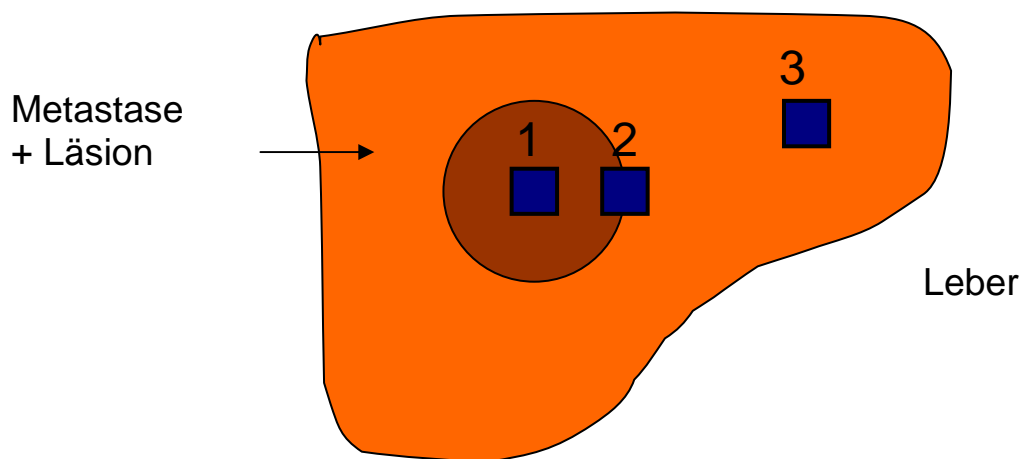


Abb. 1: Entnahmeorte der Gewebeproben, 1 = Tumorzentrum, 2 = Tumorrand, 3 = Normales Lebergewebe

3.6 Versuchsprotokoll

Vor Beginn der jeweiligen Ablationstherapie wurden die Tiere in 7 Gruppen randomisiert (siehe Tab. 1). In der Kontrollgruppe (Gruppe 1) wurde keine Behandlung durchgeführt und die Probeentnahme fand direkt statt. Die Probeentnahme in den jeweiligen Ablationsgruppen ohne Aprotinin (Gruppen 2 bis 4) erfolgte jeweils an drei unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden nach Ablation (gekennzeichnet als A, B, C) (siehe Abb. 2). In den Aprotinigruppen (Gruppen 5 bis 7) fand die Probeentnahme 3 Stunden nach Ablation statt.

Gruppe	Behandlung	Anzahl ausgewertete Tiere	Probeentnahme in h nach Ablation
1	keine	10	direkt
2-A	KRYO	6	1
2-B	KRYO	5	3
2-C	KRYO	5	6
3-A	RFA	6	1
3-B	RFA	5	3
3-C	RFA	5	6
4-A	LITT	5	1
4-B	LITT	5	3
4-C	LITT	5	6
5	KRYO + Aprotinin	6	3
6	RFA + Aprotinin	6	3
7	LITT + Aprotinin	6	3

Tab. 1: Versuchsgruppen (KRYO = Kryoablation, RFA = Radiofrequenzablation, LITT = Laserablation)

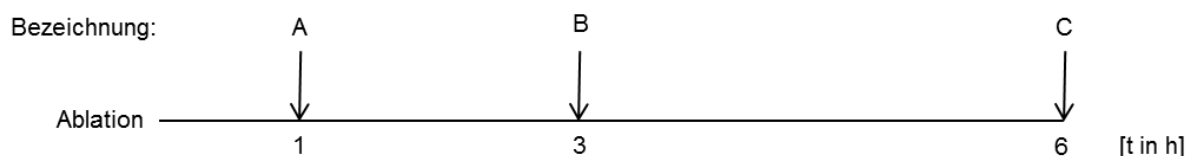


Abb. 2: Zeitverlauf der Probeentnahme nach Ablation und Bezeichnung innerhalb der Gruppen 2, 3 und 4

3.7 Zymographie

Um die aktiven Formen der Proteine darzustellen, eignet sich die Zymographie sehr gut zum qualitativen und semiquitativen Nachweis. Auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden einheitlich verdünnte Proben mit jeweils der gleichen Menge aufgetragen. Das SDS-Polyacrylamidgel enthielt bovine Gelatine. Zur Auftrennung der Proteine jedes Lysates nach ihrem spezifischen Molekulargewicht wurde in einer Elektrophoresekammer eine Spannung angelegt. Um die Proteine zu identifizieren, wurde ein Marker (HT 1080, Proteinextrakte einer menschlichen Fibrosarkomzelllinie, bereits im kardiologischen Labor der Universitätsklinik des Saarlandes etabliert [121]) aufgetragen, der die zwei zu untersuchenden MMP's (MMP-2 und MMP-9) enthält und somit als Kontrolle mitlief. Die Auftrennung in der Elektrophoresekammer erfolgte unter geringer Spannung und möglichst niedriger Temperatur, so dass die Proteine inaktiv blieben. Über 12 Stunden wurde anschließend das Gel bei 37°C inkubiert, um die Gelatinasen zu aktivieren, die nun wiederum die im Gel enthaltene Gelatine spalteten. Um die so entstandenen Aussparungen im Elektrophoresegel darzustellen, musste eine Färbung mittels Coumassie-Blau durchgeführt werden. Da sich die gespaltene Gelatine nicht mehr anfärben ließ, konnte man nun einen Rückschluss auf die vorhandenen MMP's in diesem Bereich ziehen und aufgrund von Größe und Intensität der Banden einen semiquitativen Nachweis durchführen. Nachfolgend werden alle einzelnen Schritte detailliert nochmals aufgeführt.

3.7.1 Probegewinnung für die Zymographie

Die vorher entnommenen und bei -80°C eingefrorenen Proben wurden auf einer mit Trockeneis gekühlten Glasplatte zurechtgeschnitten. Das zu untersuchende Material wurde mittels einer Pinzette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), das von außen durch Eis gekühlt wurde, umgefüllt.

Kurz vorher wurde das Gewicht des Materials bestimmt und nach folgender Formel Extraktionspuffer in das Eppendorf-Reaktionsgefäß zugefügt:

Gewicht in g x 5 = Menge Extraktionspuffer in ml

Anschließend wurde dieses Gemisch unter ständigem externen Kühlen mittels eines Potter-Gerätes 2-3 Minuten vermischt und das Gewebematerial mittels Homogenisator zerkleinert, bis sich eine homogene Flüssigkeit zeigte.

Anschließend erfolgte eine Rotation der Proben 12-24 Stunden über Kopf bei 4°C im Kühlraum.

Danach wurde 10 Minuten bei 4°C 1200x G zentrifugiert (entspr. 5000rpm der SIGMA Laborzentrifuge, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland).

Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Das Pellet wurde verworfen.

3.7.2 Proteinbestimmung für die Zymographie

Um die Gesamtmenge der Proteine im Lysat der Gewebeproben zu bestimmen, wurde die Methode von Lowry et al. angewendet [72]. Dies ist eine der Biuret-Methode verwandte, kolorimetrische Methode. Zunächst wurde in einer alkalischen Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet (Biorad, Dc Protein Assay Reagent A). Im zweiten Schritt wurde ein Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Biorad®, Dc Protein Assay Reagent B) zugegeben, der durch den ersten Komplex reduziert wird. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 750 nm. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden nochmals aufgeführt.

Es wurde stets eine Doppelbestimmung durchgeführt. 2 µl der oben beschriebenen aufbereiteten Probe wurden mit 38 µl Aqua dest. versetzt, so dass sich eine Verdünnung von 1:20 ergab. Anschließend wurden 100 µl Reagenz A und 800 µl Reagenz B zugeführt. Als Leerwert wurden 40 µl A. dest. mit den beiden Reagenzien versetzt. Dieses Gemisch musste 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden und anschließend innerhalb von 30 Minuten die Messung mittels Standardkurve durchgeführt werden (Protein Assay Lowry (hoch), Wellenlänge 750 nm). Aus den erhaltenen Konzentrationen in mg/ml wurde anschließend ein Mittelwert gebildet. Um eine Standardisierung der Einfüllmenge in das Gel zu erreichen, wurde das Volumen nach folgender Formel berechnet:

$$25 / \text{Konzentration [mg/ml]} = \text{Einfüllmenge in } \mu\text{l}$$

3.7.3 Gelzusammensetzung für die Zymographie

Es wurden ein Laufgel und ein Sammelgel benötigt. Diese setzten sich wie folgt zusammen (Angaben für Minigel):

Laufgel (Untere Schicht):

Monomer (30% Acrylamide/bis solution 29:1 (3,3% C))	2,33 ml
Puffer 4% SDS (Zusammensetzung s.u.)	1,75 ml
Gelatine 3 mg/ml	2,33 ml
Aqua dest.	0,5 ml
10% APS	70 µl
TEMED	3,5 µl

Sammelgel (Obere Schicht):

Monomer (30% Acrylamide/bis solution 29:1 (3,3% C))	0,5 ml
Puffer 4% SDS (Zusammensetzung s.u.)	0,625 ml
Aqua dest.	1,375 ml
10% APS	25 µl
TEMED	1,25 µl

Puffer für Gele:

Laufpuffer für 200 ml:

1,5 M Tris = 36,3 g

4% SDS = 8 g SDS (musste unter dem Abzug zugegeben werden)

pH = 8,8

ad 200 ml mit A. dest.

Sammelpuffer für 200 ml:

0,5 M Tris = 12 g

0,4 % SDS = 0,8 g

pH = 6,8

ad 200 ml A. dest.

3.7.4 Durchführung der Zymographie

Die Durchführung der Zymographie erfolgte mit dem System Mini-PROTEAN® II von BIO-RAD. Zuerst wurden die Glasplatten vorbereitet und durch Spacer getrennt. Danach wurden die Glasplatten in die vorgesehene Klemme eingebracht und diese anschließend auf den Gelstand montiert, so dass der untere Rand der Glasplatten dicht verschlossen blieb. Nun wurde vorsichtig das Laufgel eingefüllt. Direkt nach dem Einfüllen erfolgte eine Überlagerung des Gels mit Aqua dest. und eine anschließende Polymerisierung für 45 Minuten. Danach wurde das überstehende Aqua dest. entfernt und das Sammelgel über das Laufgel gegossen. Sofort im Anschluss wurde der Slot-Spacer eingefügt. Nach erneuten 45 Minuten wurde der Spacer vorsichtig entfernt und die Slots mittels A. dest. ausgiebig gereinigt. Nun erfolgte das Abbauen der Gelkammern vom Gießstand und Einfügen derselbigen in die Gelkammer. Diese wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

Aus den vorbereiteten, aufgetauten und gevortexten Proben wurde schließlich die jeweils vorher berechnete Einfüllmenge entnommen und in erneute Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt. Diese wurden vor dem Befüllen mit 3 µl Neutralisationspuffer und 3,5 µl Loading Buffer versetzt und nochmals gevortext. Danach wurden die Gelslots sorgfältig mittels einer µl-Spritze befüllt.

Anschließend erfolgten das Aufsetzen des Deckels und der Anschluss an das Power-Supply (Bio-Rad, Power/Pac 200). Die Sammelphase wurde bei 25 mA, die Laufphase bei 35 mA durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig von den beiden Glasplatten gelöst und zurechtgeschnitten. Danach erfolgte eine Inkubation in 2,5%iger Triton-X-Lösung 3 x 20 min. auf dem Horizontal-Schüttler (Heidolph Polymax 1040, Schwabach, Deutschland) bei 30 Umdrehungen pro Minute. Anschließend wurde das Gel in Substratpuffer 12-18 Stunden bei 37°C inkubiert, um die Reaktion der MMP's zu aktivieren.

Nach Herausnahme aus dem Substratpuffer wurden die Gele für 1-2 Stunden in einer Coumassielösung angefärbt und anschließend 3 x 20 min. durch die Entfärbelösung auf dem o.g. Schüttler wieder entfärbt, so dass die Banden sichtbar wurden. Um die Gele zu konservieren, wurde zunächst eine Cellulose-Unterlage zurechtgeschnitten und das Gel in GelAir Cellophane Support (Bio-Rad, München, Deutschland) eingelegt. Anschließend erfolgte eine Trocknung unter Kompression.

3.7.5 Probeauftragung für die Zymographie

Die einzelnen Gele wurden nach folgender Reihenfolge befüllt: Zunächst wurde der bereits erwähnte standardisierte Marker aufgetragen (HT1080), anschließend die Kontrollgruppe und danach die einzelnen Behandlungsgruppen (z.B. Kryoablation und RFA). Die Reihenfolge der aufgetragenen Gewebelysate bestand aus Tumorzentrum, Randgewebe und normalem Lebergewebe (siehe Abb. 3). Die Auftragemenge richtete sich nach der jeweils gemessenen Proteinkonzentration und wurde mittels der schon oben genannten Formel errechnet: $25 / \text{Konzentration [mg/ml]} = \text{Einfüllmenge in } \mu\text{l}$. Von dem Marker HT1080 wurden jeweils 5 μl eingefüllt.

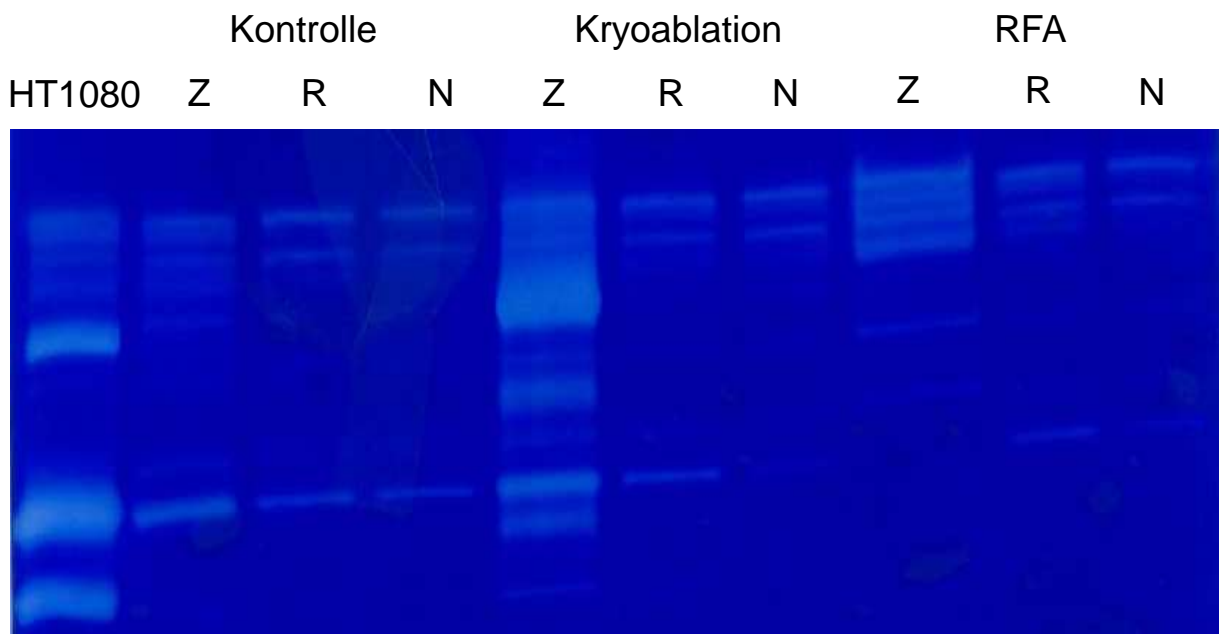


Abb. 3: Zymographie-Gel: HT1080 = Marker, Z = Tumorzentrum, R = Randgewebe, N = normales Lebergewebe.

3.7.6 Liste der verwendeten Substanzen

30% Acrylamide/bis solution 29:1 (3,3% C))	: Bio-Rad, München, Deutschland
Gelatine Type B	: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCL (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid):	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂ (Calcium chlorid dihydrat)	: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Succrose	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coumassie Brilliant Blue R-250	: Bio-Rad, München, Deutschland
Ethanol (LiChrosolv®)	: Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig)	: Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X 100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protein Assay Reagent A (alkaline copper tartrate solution)	: Bio-Rad, München, Deutschland
Protein Assay Reagent B (dilute Folin reagent)	: Bio-Rad, München, Deutschland
Kakodylsäure (Dimethylarsinsäure)	: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland
ZnCl ₂ (Zinkchlorid)	: Merck, Darmstadt, Deutschland
NaN ₃ (Natriumazid)	: Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.7.7 Auswertung der Zymographien

Zunächst mussten die einzelnen Banden identifiziert werden. MMP-9 wird bei 92 kDa, die aktivierte MMP-9 bei 82 kDa angezeigt. MMP-2 erscheint bei 72 kDa und die aktivierte MMP-2 bei 62 kDa. Zusätzlich zeigt der mitaufgetragene Marker HT 1080 die einzelnen Banden (siehe Abb. 4).

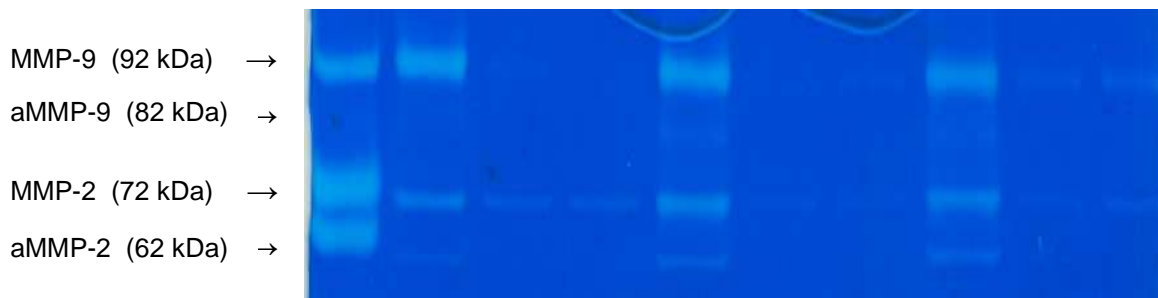


Abb. 4: Zymographie-Gel: Angezeigt sind die Banden von MMP-9 bei 92 kDa, aktivierter MMP-9 (aMMP-9) bei 82 kDa, MMP-2 bei 72 kDa und aktivierte MMP-2 (aMMP-2) bei 62 kDa.

Die Auswertung der angefertigten Zymographien erfolgte mittels Geldokumentationssystem (Quantity One, Geldoc, Bio-Rad, München, Deutschland). Die Signalstärke wird dabei in der Einheit INT*mm² angegeben. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Gele zu erreichen, wurde der Hintergrund vermessen und in die Werte miteingerechnet (Background Subtraction Method), so dass sich hintergrundkorrigierte Absolutwerte ergaben (siehe Abb. 5).

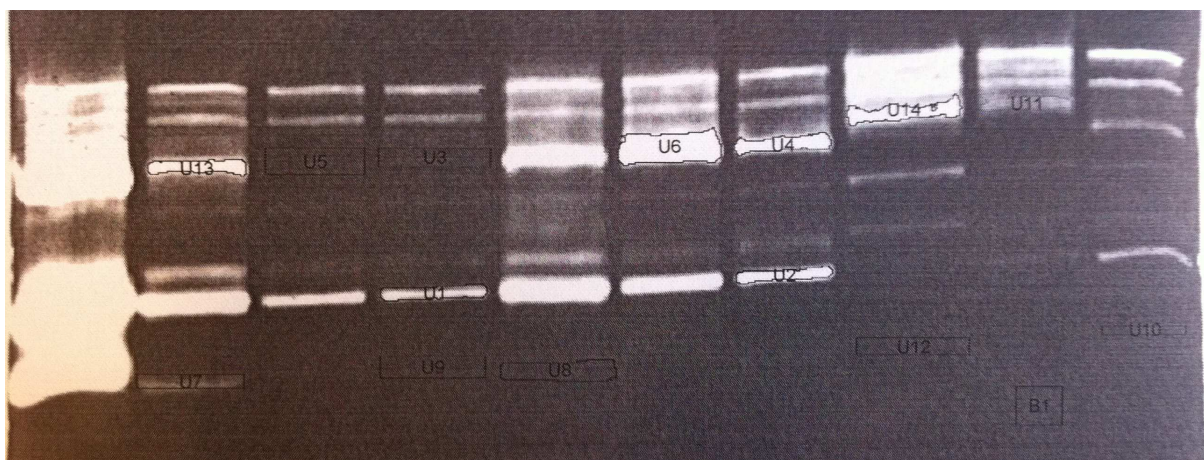


Abb. 5: Auswertung der Zymographien mittels Geldoc: B1 = Hintergrund, z.B. U6 = MMP-9-Expression von 2-5-C-R (Kryoablation, Tiernummer 5, Entnahme nach 3 Stunden, Randgewebe). Zur Objektivierung wurde der Hintergrund B1 in den Absolutwert von U6 eingerechnet (Background Subtraction Method). Bei U6 ergab sich zunächst der Wert 17235 INT*mm², der hintergrundkorrigierte Wert betrug 11835 INT*mm².

3.8. Histologie

3.8.1 Aufbereitung der Proben

Wie bereits oben beschrieben, erfolgte eine direkte Fixierung der entnommenen Proben in einer Einbettkassette (VWR, Darmstadt, Deutschland) in 4%igem Formaldehyd (Roti[®]-Histofix, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und in Aqua dest. gespült. Danach in Hämatoxin nach Böhler für 7 Minuten eingelegt und anschließend erneut mit Aqua dest. gespült. Zur Differenzierung wurden nun die Schnitte 5-6 mal in HCl-Alkohol eingetaucht und erneut mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde 7 min. lang mit Leitungswasser fließend gebläut und wieder mit Aqua dest. gespült. Danach erfolgte das Einlegen der Schnitte für 25 Sekunden in Eosin und ein erneutes kurzes Spülen mit Aqua dest. Anschließend wurden die Schnitte je 3 min. in eine aufsteigende Alkoholreihe eingelegt (70% bis absoluter Ethanol) und darauffolgend 3 x 3 min. in Xylol. Abschließend erfolgte das Eindecken mittels Deckglas.

3.8.2 Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte am Auflichtmikroskop (Olympus Bx 60), einer Kamera (Axio Cam HRC, Zeiss) und einem speziellen Computerprogramm (Axio-Vision 3.1, Zeiss). Histomorphologisch wurden das normale Lebergewebe, das Randgewebe der Ablationszone und das Zentrum der Ablationszone nach verschiedenen Gesichtspunkten untersucht (siehe Tab. 2). Zunächst wurde die Leberläppchen- und Azinusstruktur (Thema a) in einer 10fachen Vergrößerung beurteilt. Anschließend erfolgte eine Beurteilung der intralobulären Balkenstruktur (Thema b), der intralobulären Zellfragmente (Thema c), des Ausmaßes der Einblutung (Thema d), der Intaktheit der Hepatozyten (Thema e) und der Anzahl an pyknotisch veränderten Zellkernen (Thema f) in einer 20fachen Vergrößerung. Im Bereich des Ablationsrandes wurde zusätzlich die Abgrenzung der Läsion zum umliegenden Lebergewebe (Thema k) in einer 10fachen Vergrößerung untersucht. Ebenfalls in einer 10fachen Vergrößerung wurden die Gefäße hinsichtlich von Zell- und Fibrinthromben (Thema Gefäße a und b) beurteilt. Die histologische

Beurteilung jeden Themas erfolgte bezüglich des Normalgewebes in 5 Feldern, bezüglich der Randzone und des Zentrums in 10 Feldern und bezüglich der Gefäße in 5 Feldern. Zur semiquantitativen Auswertung wurde das unten aufgeführte Punktesystem verwendet (siehe Tab. 2).

Normale Leber (N)

Thema	Vergrößerung	Themabezeichnung	Score	Felder
a	(10er)	Leberläppchen-/Azinusstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	5
b	(20er)	intralobuläre Balkenstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	5
c	(20er)	rote Fragmente / Zellschrott intralobulär	0 = keiner, 3 = viel	5
d	(20er)	Blutung / Einblutung, Anteil der Erythrozyten pro Ausschnitt	0 = 1-10%, 1 = 10-30%, 2 = 30-50%, 3 = > 50%	5
e	(20er)	Hepatozyten intakt	0 = 100%, 1 = 70-100%, 2 = 50-70%, 3 = <50%	5
f	(20er)	Zellkerne (Hepatozyten)	0 = erhalten/normal, 3 = pyknotisch/schwarz	5

Ablationszone (Rand = R)

Thema	Vergrößerung	Themabezeichnung	Score	Felder
a	(10er)	Leberläppchen-/Azinusstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	10
b	(20er)	intralobuläre Balkenstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	10
c	(20er)	rote Fragmente / Zellschrott intralobulär	0 = keiner, 3 = viel	10
d	(20er)	Blutung / Einblutung, Anteil der Erythrozyten pro Ausschnitt	0 = 1-10%, 1 = 10-30%, 2 = 30-50%, 3 = > 50%	10
e	(20er)	Hepatozyten intakt	0 = 100%, 1 = 70-100%, 2 = 50-70%, 3 = <50%	10
f	(20er)	Zellkerne (Hepatozyten)	0 = erhalten/normal, 3 = pyknotisch/schwarz	10
k	(10er)	glatte (0) oder diffuse (1) Abgrenzung zu N	0 = nein, 1 = ja	10

Ablationszone (Zentrum = Z)

Thema	Vergrößerung	Themabezeichnung	Score	Felder
a	(10er)	Leberläppchen-/Azinusstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	10
b	(20er)	intralobuläre Balkenstruktur	0 = keine, 3 = unveränderte Struktur	10
c	(20er)	rote Fragmente / Zellschrott intralobulär	0 = keiner, 3 = viel	10
d	(20er)	Blutung / Einblutung, Anteil der Erythrozyten pro Ausschnitt	0 = 1-10%, 1 = 10-30%, 2 = 30-50%, 3 = > 50%	10
e	(20er)	Hepatozyten intakt	0 = 100%, 1 = 70-100%, 2 = 50-70%, 3 = <50%	10
f	(20er)	Zellkerne (Hepatozyten)	0 = erhalten/normal, 3 = pyknotisch/schwarz	10

Gefäße (G)

Thema	Vergrößerung	Themabezeichnung	Score	Felder
a	(10er)	Thrombosiert	0 = nein, 1 = ja	5
b	(10er)	Fibrin	0 = nein, 1 = ja	5

Tab. 2: Score-Tabelle und beurteilte Kriterien zur semiquantitativen Auswertung der histologischen Schnitte.

3.9 Statistik

Die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung erfolgten nach Prüfung auf Normalverteilung mittels der Computerprogramme Sigma Plot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland), Sigma Stat for Windows (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und GraphPad Prism 5.03 for Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Die in den Auswertungen angegebenen Daten sind Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM). Bei den Vergleichen zwischen den Versuchsgruppen wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (one way ANOVA) durchgeführt und danach bei Vergleichen mehrerer Gruppen der post-hoc Student-Newman-Keuls Test, bei Untersuchung von nur 2 Gruppen der t-Test vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Anzahl, Gewicht und Überleben der Versuchstiere

Es wurden insgesamt 75 Versuchstiere ausgewertet (siehe Tabelle 1), das durchschnittliche Gewicht betrug bei der ersten Operation (Implantation des Tumors) 176,94g ($\pm 19,13$ g), bei der zweiten Operation (Behandlung durch die verschiedenen Ablationsverfahren bzw. nur Explantation des Tumors) 174,16g ($\pm 17,43$ g). Ungeplant verstorben waren insgesamt 12 Versuchstiere. Die jeweilige Behandlung und Explantation der Tumore erfolgte immer 14 Tage nach Tumorimplantation. Bei 11 Versuchstieren kam es bei Präparation zu einer nicht relevanten iatrogenen Leberläsion.

4.2 Qualität und Ausmaß der Tumoren und Größe der Läsionen

Die Auswertungsqualität der Tumore wurde durch einen Score bestimmt:

- 1 = isoliert und subkapsulär
- 2 = isoliert
- 3 = eingeschränkte Auswertung
- 4 = keine Auswertung möglich

Die Gesamtqualität lag bei $1,04 \pm 0,19$. 25 der Versuchstiere zeigten bei der zweiten Operation mehr als nur einen isolierten Lebertumor (2-5 Tumore). Eine diffuse Tumorausbreitung fand sich nur in drei Fällen. Eine Tumorausbreitung im Stichkanal zeigte sich bei 43 Versuchstieren, an der Einstichstelle allerdings nur bei 17 Tieren. In zwei Fällen kam es zu einer Peritonealmetastasierung und in 2 Fällen zu einer Metastasierung in den rechten Leberlappen.

Die Fläche der Tumore wurde durch Durchmesser a und b bestimmt, die im rechten Winkel zueinander standen und sich in der Tumormitte kreuzten. Der mittlere Durchmesser a lag bei $4,12 \pm 1,58$ mm, Durchmesser b lag bei $3,93 \pm 1,21$ mm. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Tumorfläche von $17,07 \pm 10,07$ mm².

Die durch die jeweiligen Behandlungen entstandenen Läsionen wurden ebenfalls im Durchmesser vermessen. Dabei ergab Durchmesser a $12,53 \pm 2,74$ mm und Durchmesser b $12,18 \pm 2,94$ mm. Die ermittelte Fläche betrug somit $121 \pm 90,04$ mm². Die Tiefe der Läsionen ergab im Durchschnitt $5,47 \pm 0,92$ mm.

4.3 Temperaturentwicklung des Lebergewebes während der lokalen Ablation

Die Temperaturen wurden direkt an den Sonden und in einem Abstand von 5mm und 10mm von der Selbigen gemessen. Die folgenden Darstellungen (Abb. 6, 7 und 8) zeigen die Temperaturen während der jeweiligen Ablationstherapie im Zeitverlauf.

4.3.1 Temperaturentwicklung während der Kryotherapie

Bei der Kryoablation wurde die Zeit dokumentiert, nachdem an der Ablationssonde 0°C (bei im Mittel 0,61 min.), -168°C (bei im Mittel 2,2 min. für die Dauer von 30 sek.), -30 °C (bei im Mittel 3,6 Minuten), erneut - 168°C (bei im Mittel 4,32 min. für die Dauer von 30 sek.) und 0°C (bei im Mittel 7,1 min.) erreicht wurden. Die Messung wurde nach insgesamt 12 Minuten beendet. Die Mindesttemperatur bei 5mm von der Sonde entfernt beträgt nach ca. 4,84 Minuten im Mittel $-2,28 \pm 1,62$ °C. 10mm von der Sonde entfernt erreicht die Temperatur einen Mindestwert von $15,63 \pm 0,1$ °C nach 4,84 Minuten (siehe Abb. 6).

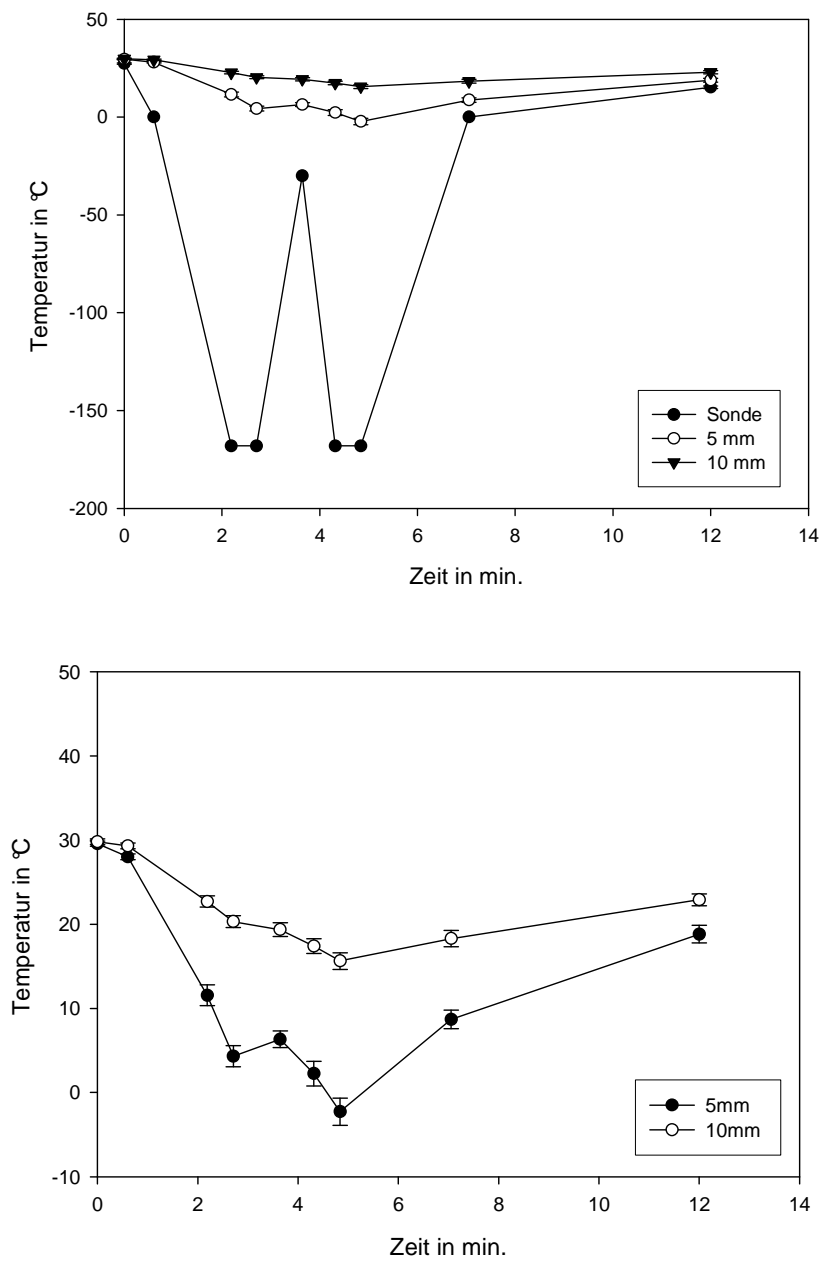


Abb. 6: Temperaturentwicklung während der Kryoablation. Der obere Graph zeigt die Temperatur der Sonde und des Lebergewebes 5mm und 10mm von der Sonde entfernt im Zeitverlauf. Der untere Graph zeigt nur die Abstandsmessungen bei 5mm und 10mm. Hier zeigt sich, dass schon 5mm von der Sonde entfernt nur noch eine Mindesttemperatur von $-2,28 \pm 1,62 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht wird. 10mm von der Sonde entfernt wird eine Mindesttemperatur von $15,63 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erlangt.

4.3.2 Temperaturentwicklung während der RFA

Da bei der Radiofrequenzablation die Sonde gekühlt wurde, ergab sich bei der Sondenmessung eine geringere Temperatur als bei 5mm und 10mm von dieser entfernt. Die Maximaltemperatur bei 5mm wurde nach 3 Minuten erreicht und beträgt $51,66 \pm 0,98 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei einem Abstand von 10mm betrug die Maximaltemperatur nach 3 Minuten $37,54 \pm 0,56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (siehe Abb. 7).

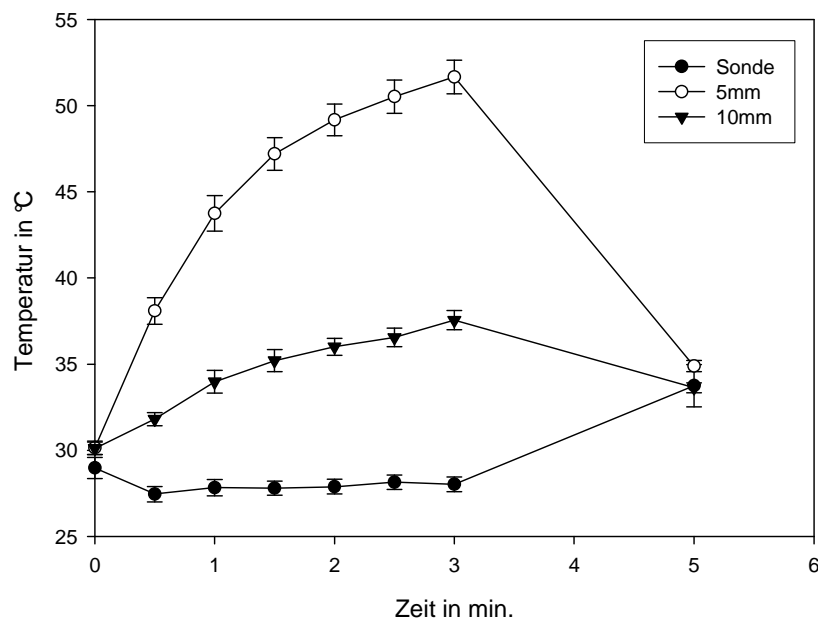


Abb. 7: Diagramm der Temperaturentwicklung bei der Radiofrequenzablation. Nach 3 Minuten kam es im Abstand von 5mm und 10mm zum Temperaturmaximum (5mm = $51,66 \pm 0,98 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10mm = $37,54 \pm 0,56 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Da die Sonde während der Behandlung mittels NaCl-Lösung gekühlt wurde, lag die durchschnittliche Temperatur unterhalb der Abstandsmessung und blieb konstant.

4.3.3 Temperaturentwicklung während der LITT

Bei der LITT war eine direkte Sondenmessung nicht möglich. Somit erscheinen im folgenden Graphen nur Messungen bei 5mm und 10mm. Das Temperaturmaximum, 5mm von der Ablation entfernt, wurde nach 5 Minuten erreicht und beträgt $62,21 \pm 1,82 \text{ }^{\circ}\text{C}$. 10mm entfernt, erreichte die Temperatur im Maximum nach 5 Minuten $39,02 \pm 0,75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (siehe Abb. 8).

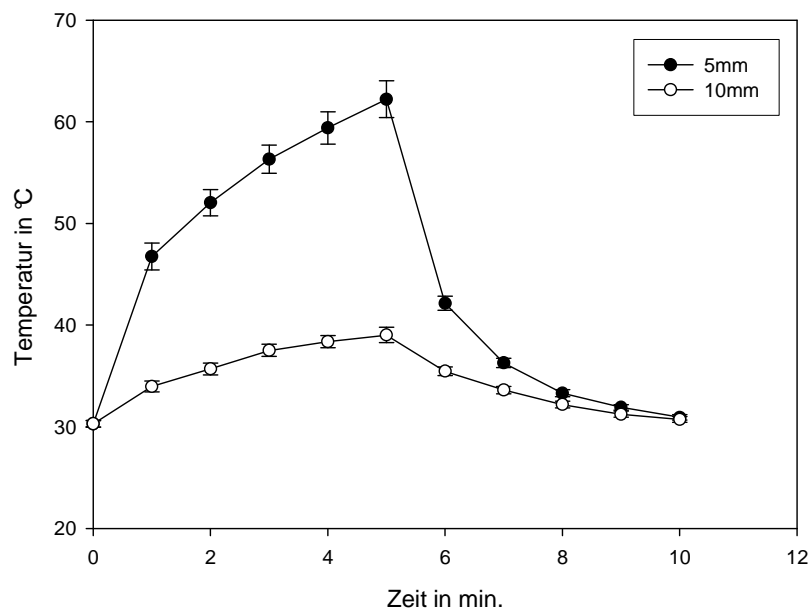


Abb. 8: Darstellung der Temperaturverläufe bei LITT. Das Maximum bei 5mm und 10mm wurde nach 5 Minuten erreicht (5mm = $62,21 \pm 1,82 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10mm = $39,02 \pm 0,75 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Da die Lasersonde keine Temperaturmessung beinhaltet, kommt die Temperatur innerhalb des Ablationszentrums nicht zur Darstellung.

4.4 Histomorphologische Auswertung

Alle Schnitte wurden nach erfolgter HE-Färbung im Auflichtmikroskop nach oben bereits erwähntem Score ausgewertet (siehe Tab. 2). In Abb. 9 sind exemplarisch Schnitte des normalen Lebergewebes, des unbehandelten Tumorgewebes und des mittels der drei lokalen Ablationsverfahren behandelten Tumorgewebes.

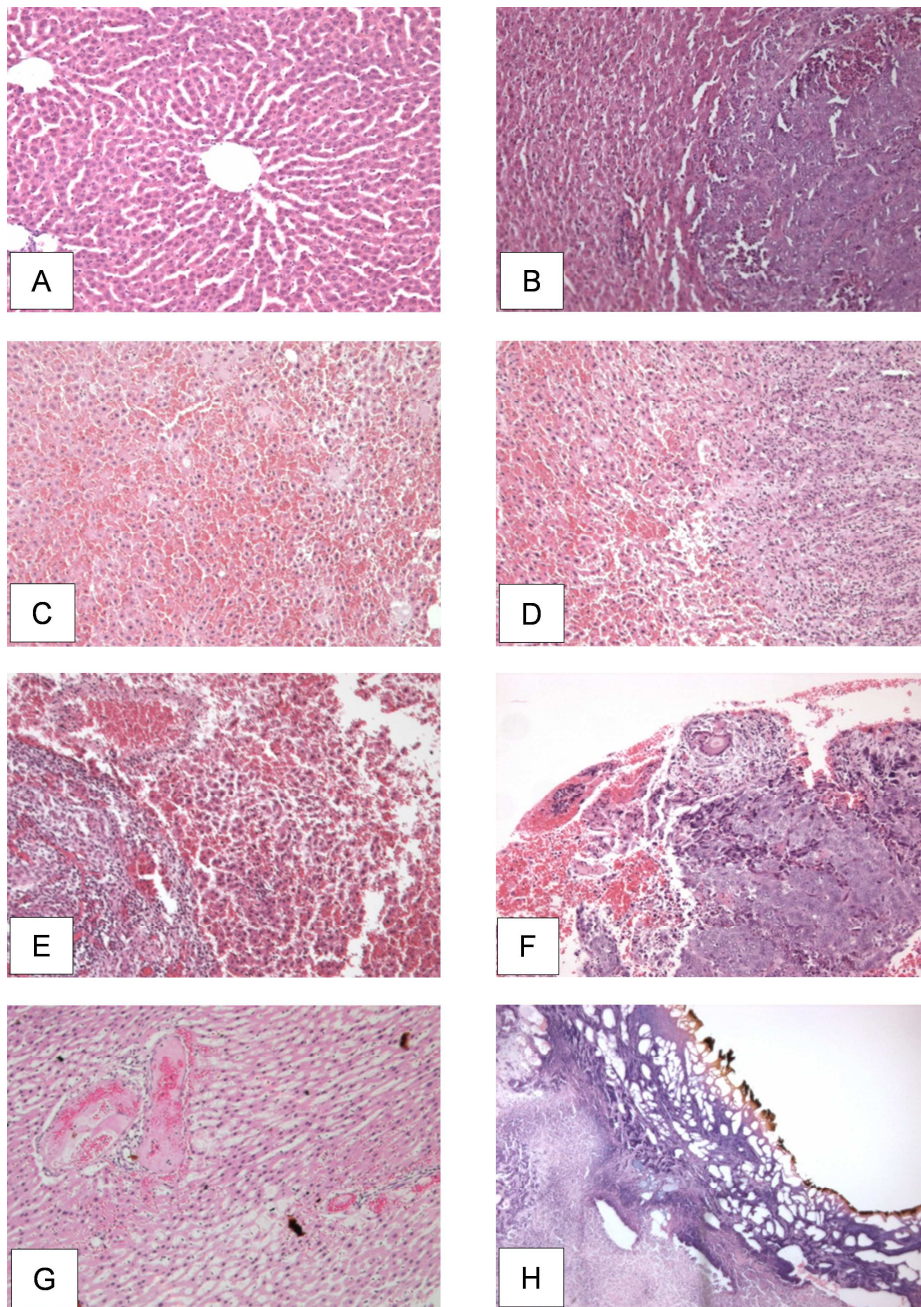


Abb. 9: Histologische Schnitte im Auflichtmikroskop: A = normales Lebergewebe, B = unbehandelter Tumor, C = Randgebiet nach Kryoablation, D = Ablationszentrum nach Kryoablation, E = Randgebiet nach RFA, F = Ablationszentrum nach RFA, G = Randgewebe nach LITT, H = Ablationszentrum nach LITT.

4.4.1 Leberläppchen- und Azinusstruktur nach lokaler Tumorablation (Thema a)

Die Leberläppchen- und Azinusstruktur zeigten erwartungsgemäß in den Proben des normalen Lebergewebes eine unveränderte Struktur. Im Vergleich dazu waren in der Kryotherapiegruppe die Strukturen der Leberläppchen im Randbereich vermindert und im Ablationszentrum nach einer Stunde, drei Stunden und sechs Stunden nahezu zerstört.

Die Azinusstruktur in der Randzone der RFA-Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe ungefähr zur Hälfte zerstört, im Bereich der Ablationszone zu ca. einem Drittel, allerdings im Vergleich zur Kryotherapiegruppe noch gering besser erhalten.

In der Gruppe der LITT-Ablation zeigte sich eine nur zu einem Drittel zerstörte Leberläppchenstruktur im Bereich der Randzone, während eine vollständige Zerstörung der Strukturen in der Ablationszone zu erkennen war.

In der Aprotiningruppe setzte sich der vorher gesehene Trend fort. Die erhaltene Leberläppchen- und Azinusstruktur zeigten sich im Vergleich zum Normalgewebe um ein Drittel in der Randzone aller drei Ablationsverfahren vermindert, die Strukturen in der Ablationszone waren nahezu vollkommen zerstört, in der LITT-Gruppe sogar nicht mehr nachzuweisen.

In allen drei Verfahren zeigte sich somit eine Zerstörung der Läppchenstruktur im Bereich der Ablationszone, wobei das LITT-Verfahren im Vergleich zu den restlichen zwei Behandlungen keine erhaltene Gewebestruktur mehr erkennen ließ (siehe Abb. 10).

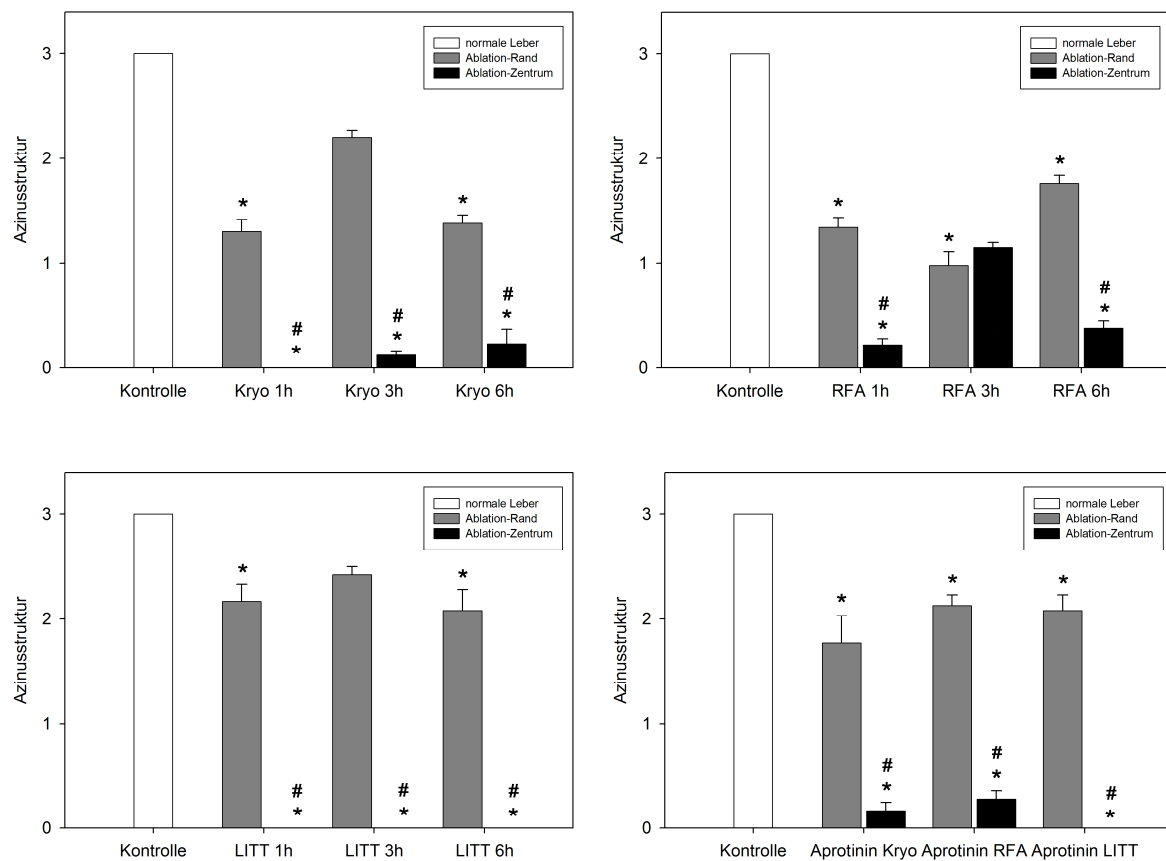


Abb. 10: Darstellung der Azinusstruktur (Thema a). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Azinusstruktur nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotininingruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. In allen Diagrammen zeigt sich vor allem die Zerstörung der Azinusstruktur im Ablationszentrum. Dies ist jeweils signifikant zur Kontrolle und zum Randgebiet.

4.4.2 Destruktion der intralobuläre Balkenstruktur nach lokaler Tumorablation (Thema b)

Das Normalgewebe zeigte eine vollständig erhaltene intralobuläre Balkenstruktur. Im Gegensatz dazu zeigte sich schon eine verminderte Balkenstruktur im Bereich der Randzone bei allen drei Ablationsverfahren, wobei die Struktur bei der LITT etwas besser erhalten schien. In der Ablationszone erkannte man eine deutliche Zerstörung der Balkenstruktur von ungefähr zwei Drittel bei Kryo und RFA, im LITT-Verfahren sogar eine nahezu vollständige Elimination. Die gleichzeitige Applikation von Aprotinin zeigte ein ähnliches histomorphologisches Ergebnis in Bezug auf die intralobuläre Balkenstruktur nach drei Stunden (siehe Abb. 11).

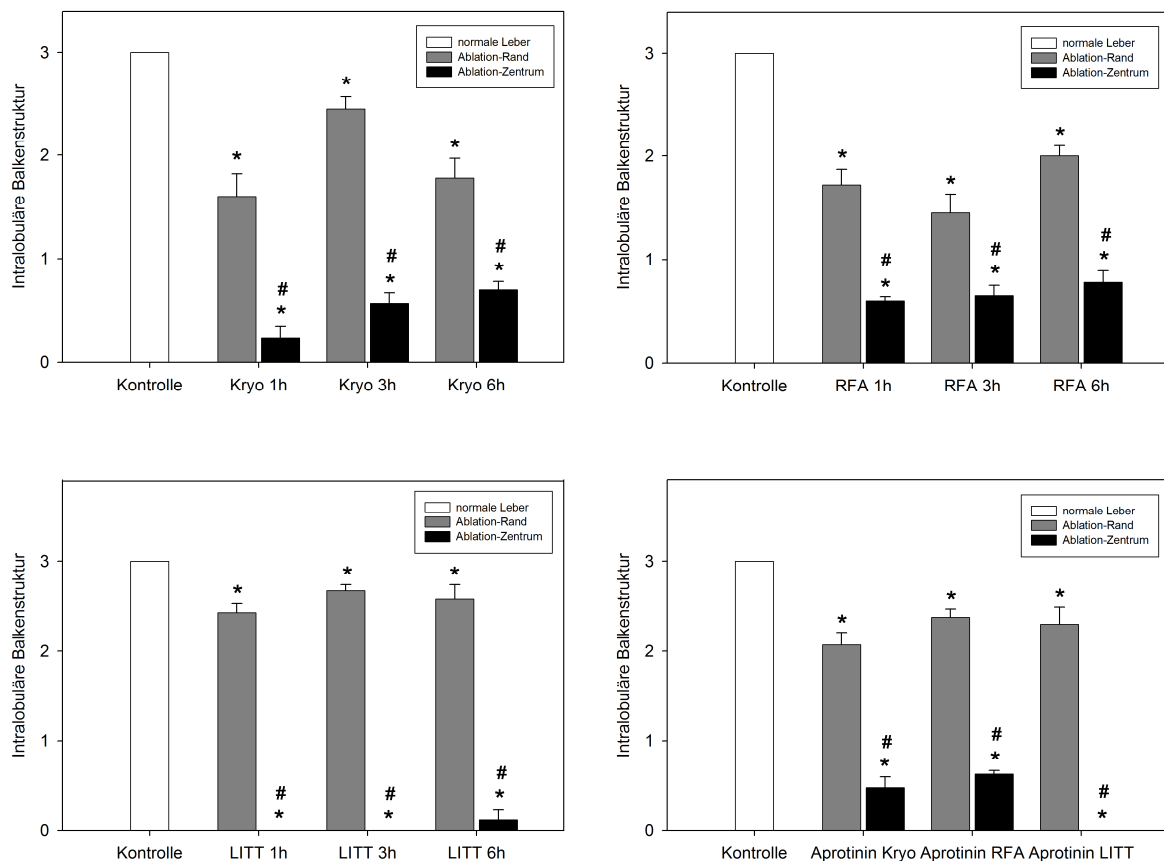


Abb. 11: Darstellung der intralobulären Balkenstruktur (Thema b). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Balkenstruktur nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Trasyolgruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. In allen Diagrammen zeigt sich vor allem die Zerstörung der intralobulären Balkenstruktur im Ablationszentrum. Dies war jeweils signifikant zur Kontrolle und zum Randgebiet.

4.4.3 Vorhandensein von intralobulären Zellfragmenten nach lokaler Tumorablation (Thema c)

Während in der Kontrollgruppe kein intralobulärer Zellschrott zu erkennen war, zeigten alle drei Ablationsmethoden eine deutliche Erhöhung zunächst in der Randzone. Weitaus mehr intralobulärer Zellschrott und rote Fragmente ließen sich in der Ablationszone jeder Verfahren erkennen, wobei diese bei der LITT-Gruppe noch höher ausfielen als in den restlichen Methoden. Die Aprotiningruppe zeigte einen ähnlichen Trend (siehe Abb. 12).

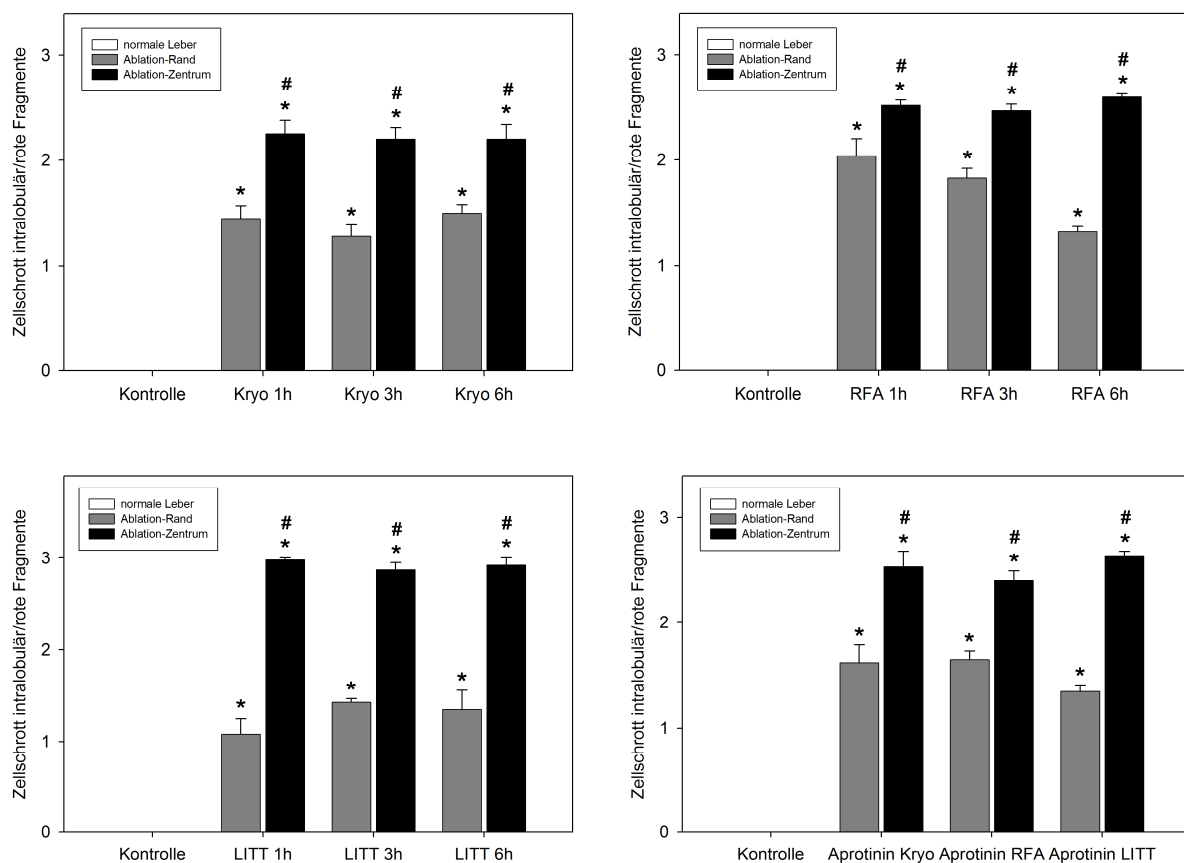


Abb. 12: Darstellung des intralobulären Zellschrottes (Thema c). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Trasyolgruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. In allen Diagrammen zeigt sich vor allem im Ablationszentrum eine signifikant gegenüber Kontrolle und Randgebiet erhöhte Anzahl an intralobulärem Zellschrott.

4.4.4 Ausmaß der Einblutung nach lokaler Tumorablation (Thema d)

Der Anteil der Erythrozyten pro Ausschnitt lag im normalen Lebergewebe bei 1-10%. Im Randgewebe sowie in der Ablationszone der Kryotherapie zeigte sich ein Erythrozytenanteil von 30-50%. Der Anteil schien hier nach drei Stunden im Vergleich zur Einstundenprobe erhöht. In der RFA-Gruppe erkannte man ebenfalls im Randgebiet einen Anteil von 30-50%, wohingegen hier in der Ablationszone nur noch 10-30% Erythrozyten pro Ausschnitt zu finden waren. Nach drei Stunden schien jedoch eine vermehrte Einblutung ins Ablationszentrum stattzufinden. Der prozentuale Anteil der Erythrozyten bei LITT-Ablation entsprach im Randgebiet sowie Ablationszentrum dem Normalgewebe, wobei ein leichter Anstieg im Zentrum nach sechs Stunden zu beobachten war (siehe Abb. 13).

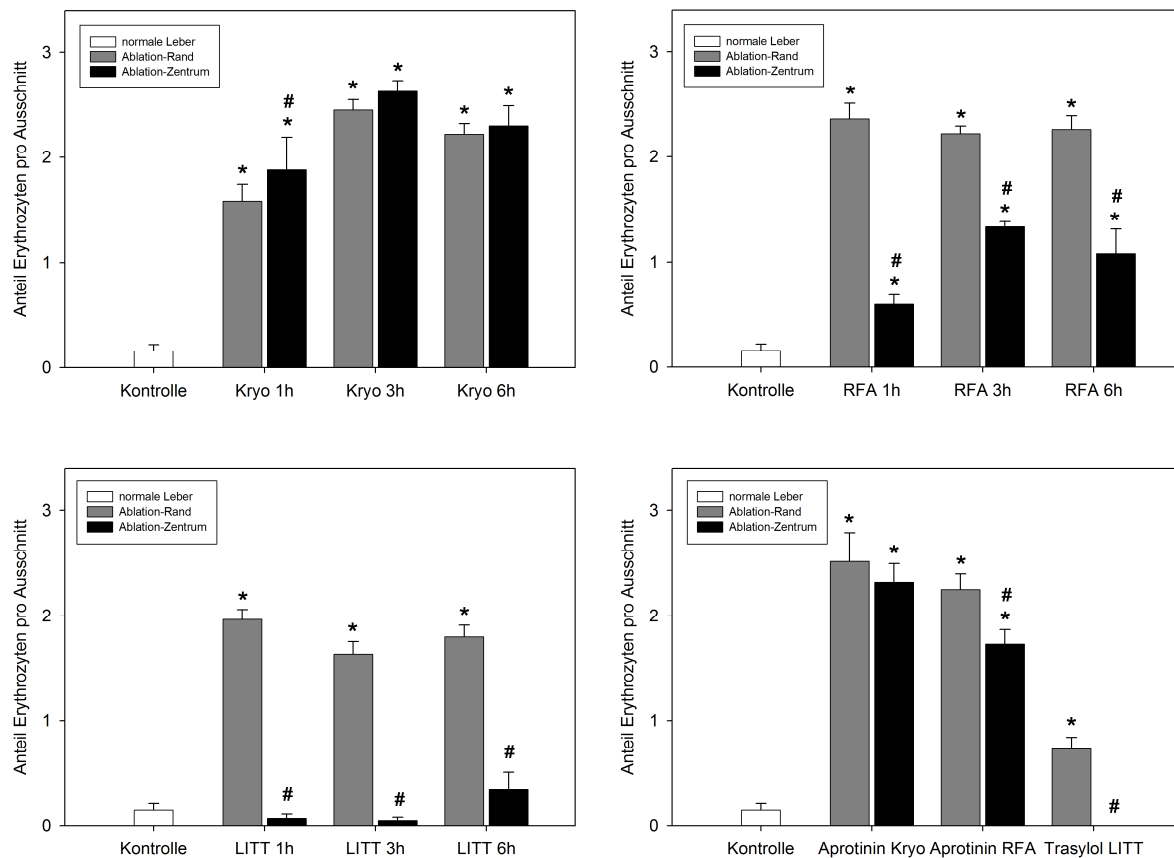


Abb. 13: Darstellung der Einblutung bzw. Anteil der Erythrozyten pro Ausschnitt (Thema d). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotininingruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. Bei der Kryoablation zeigte sich sowohl im Randgebiet als auch im Tumorzentrum ein signifikant erhöhter Anteil an Erythrozyten im Vergleich zum normalen Lebergewebe. Das Gewebe der RFA zeigte vor allem im Randbereich eine signifikant erhöhte Erythrozytenanzahl im Vergleich zum Normalgewebe, im Zentrum stellte sich ein signifikant erniedrigter Erythrozytenanteil im Vergleich zum Randgewebe dar, allerdings noch signifikant erhöht im Vergleich zum Normalgewebe. Auch bei der LITT zeigte sich im Randgebiet eine signifikant erhöhte Erythrozytenzahl, während das Zentrum weitestgehend den Werten der Kontrollgruppe entsprach.

4.4.5 Intaktheit der Hepatozyten nach lokaler Tumorablelation (Thema e)

In der Kontrollgruppe fanden sich zu annähernd 100% intakte Hepatozyten. In allen drei Ablationsverfahren reduzierte sich die Anzahl der intakten Hepatozyten im Randbereich auf 50-70% und im Ablationszentrum sogar auf bis zu <50% (siehe Abb. 14).

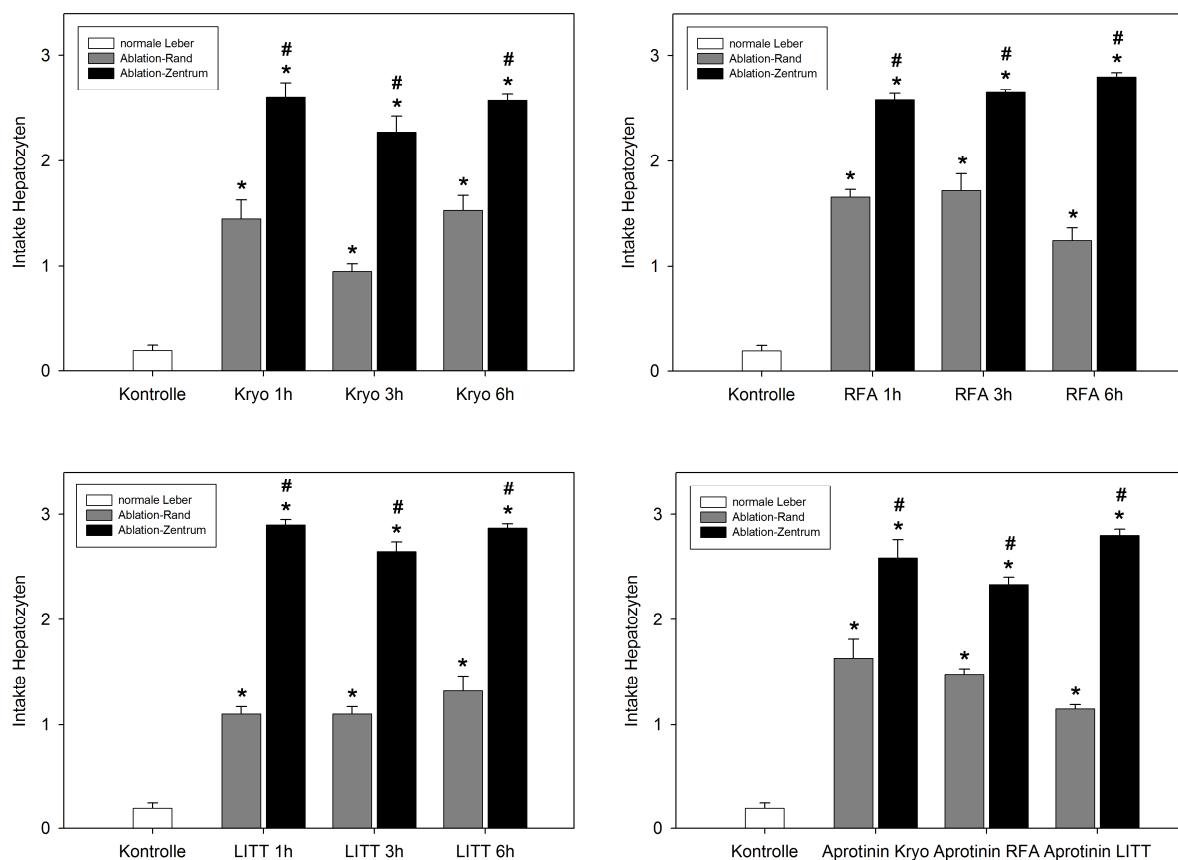


Abb. 14: Darstellung der Intaktheit der Hepatozyten (Thema e). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotinierungsgruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. In allen Verfahren zeigte sich eine signifikant hohe Anzahl an zerstörten Hepatozyten im Randgebiet sowie im Zentrum nach jeweiliger Ablation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Anzahl der intakten Hepatozyten sank im Zentrum nochmals signifikant im Vergleich zum Randgewebe.

4.4.6 Anteil an pyknotischen / schwarzen Zellkernen nach lokaler Tumorablation (Thema f)

Im Vergleich zum normalen Lebergewebe fanden sich in allen drei Ablationsverfahren vermehrte pyknotische Zellkerne sowohl im Ablationsrand als auch im Zentrum. Dabei zeigte sich eine deutliche Steigerung von Randzone zur Ablationsmitte, vor allem bei Verwendung des LITT-Verfahrens (siehe Abb. 15).

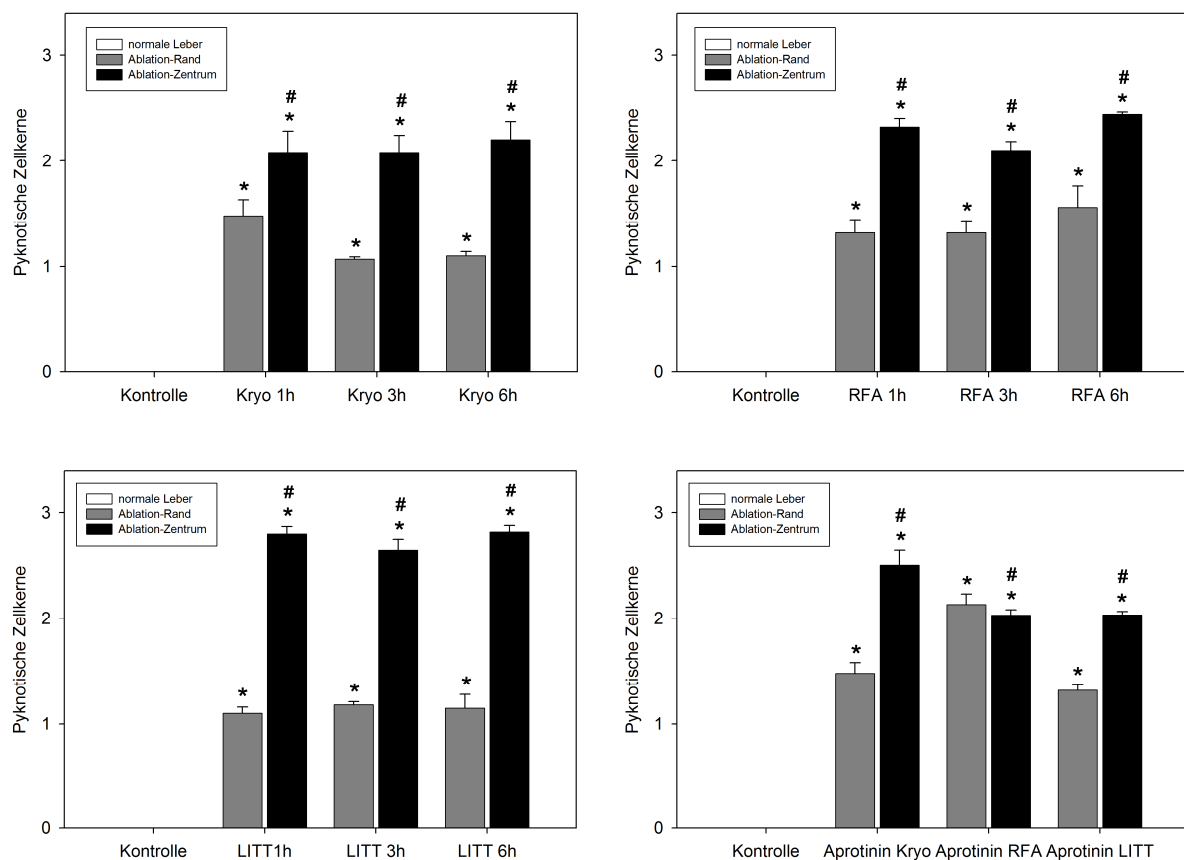


Abb. 15: Darstellung der pyknotischen Zellkerne (Thema f). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: * = vs. Kontrolle, # = Zentrum vs. Rand. Als Kontrolle wird das normale Lebergewebe der Kontrollgruppe angezeigt. Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotinigruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT. In allen Verfahren zeigte sich eine signifikant hohe Anzahl an pyknotischen Zellkernen im Randgebiet sowie im Zentrum nach jeweiliger Ablation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Ablationszentrum fand sich im Vergleich zur Randzone bei allen drei Verfahren eine signifikant höhere Anzahl an pyknotischen Zellkernen.

4.4.7 Abgrenzung der Ablationsrandzone zum Normalgewebe nach lokaler Tumorablation (Thema k)

Im Bereich der Randzonen zeigte sich, dass die Grenze bei Kryotherapie und RFA eher diffus verläuft, während die Grenzen bei der LITT glatter ausfielen (siehe Abb. 16).

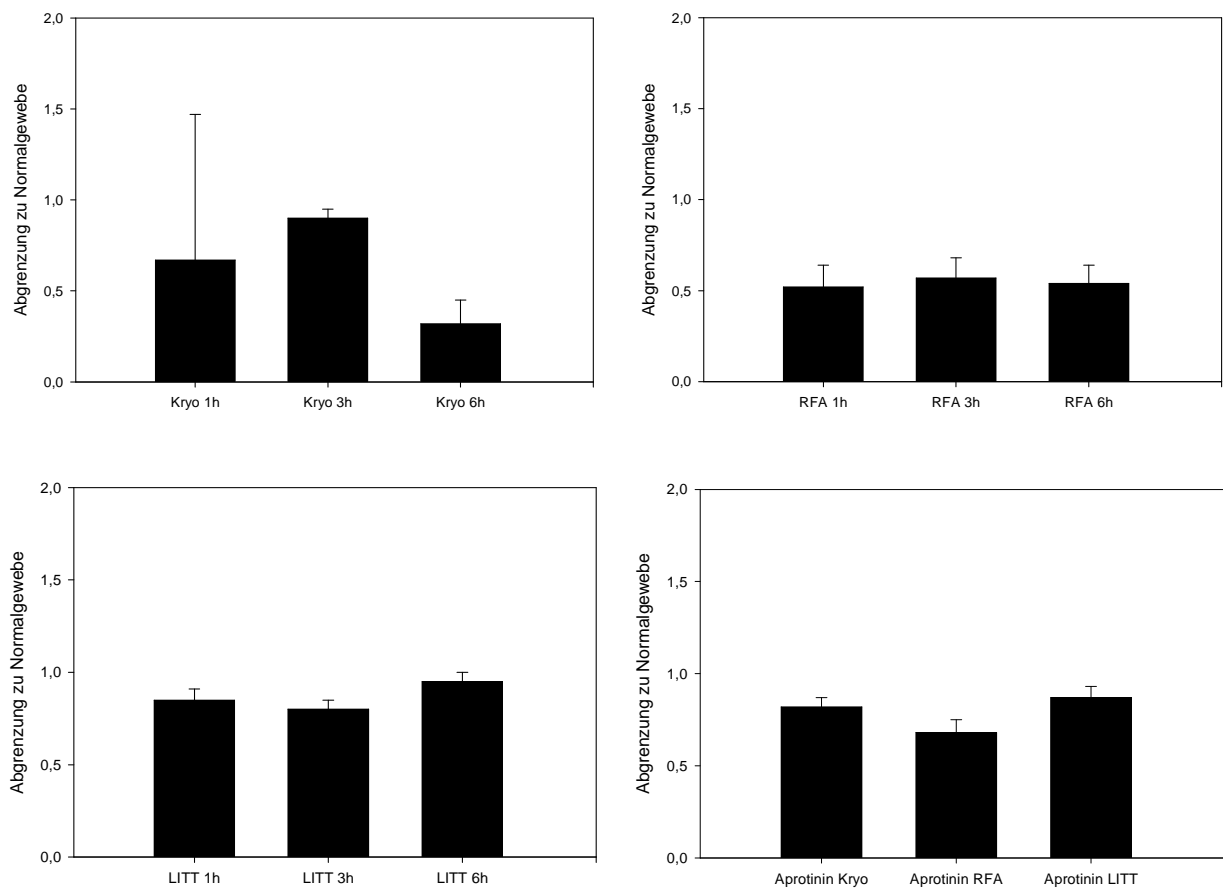


Abb. 16: Darstellung der Abgrenzung zum Normalgewebe (Thema k). Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotinigruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT.

4.4.8 Anzahl von thrombosierte Gefäßen nach lokaler Tumorablation (Thema Gefäß a)

In allen drei Ablationsverfahren zeigten sich ca. 50-60% der Gefäße thrombosiert. Bei zusätzlicher Applikation von Aprotinin stieg die Prozentzahl der thrombosierte Gefäße auf über 70% (siehe Abb. 17).

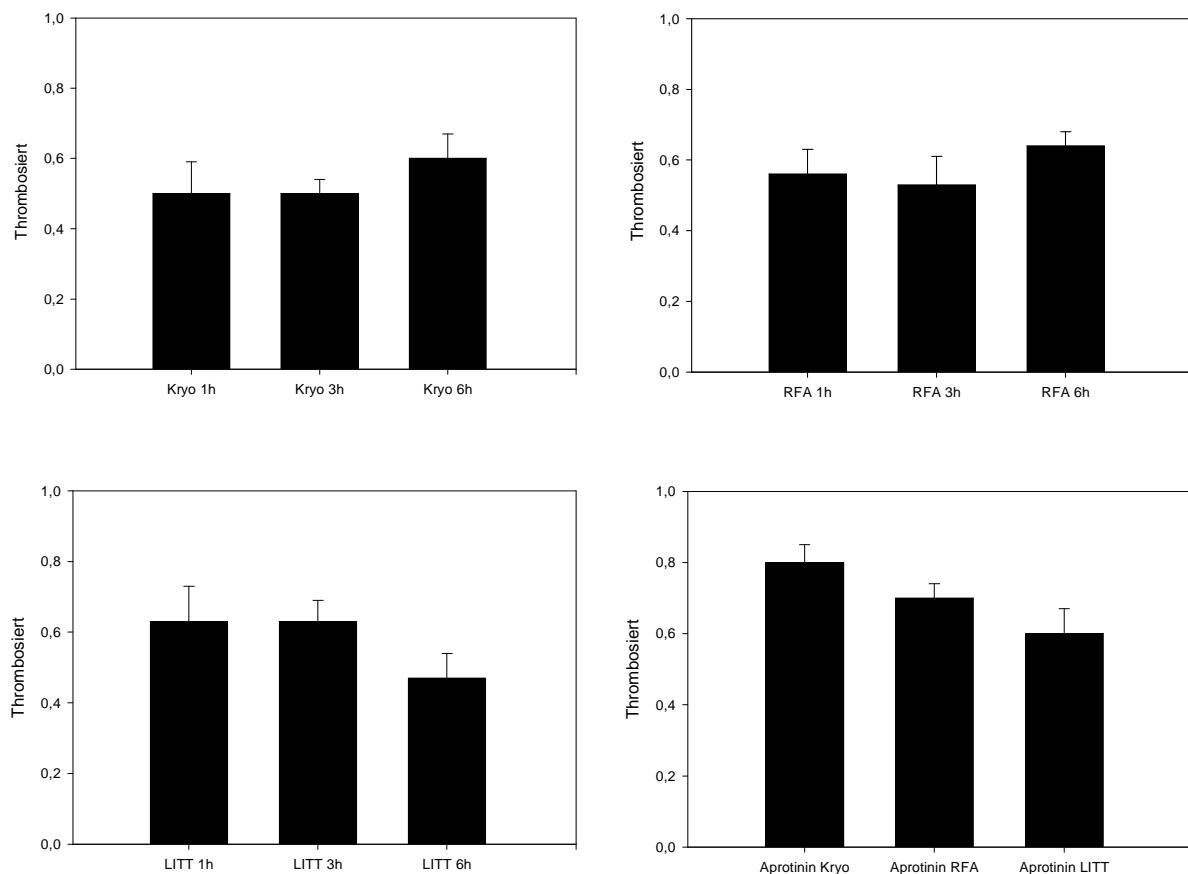


Abb. 17: Darstellung der thrombosierte Gefäße (Thema Gefäß a). Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotinigruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT.

4.4.9 Anzahl von intravaskulären Fibrinthromben nach lokaler Tumorablation (Thema Gefäß b)

Gefäße mit intravasalem Fibrin fanden sich bei Verwendung der Kryotherapie nach einer Stunde zu ca. 50%, nahmen allerdings bis sechs Stunden auf 30% ab. In der RFA-Gruppe erkannte man ca. 10-20% Gefäße mit Fibrin, der Anteil bei der LITT-Gruppe lag demgegenüber bei 50-60%.

Ein deutlicher Unterschied ließ sich bei gleichzeitiger Applikation von Aprotinin erkennen. Hier lag der Anteil der Gefäße mit intravasalem Fibrin bei fast 80% in der Kryo- und RFA-Gruppe, bei der LITT-Gruppe allerdings nur bei 30-40% (siehe Abb. 18).

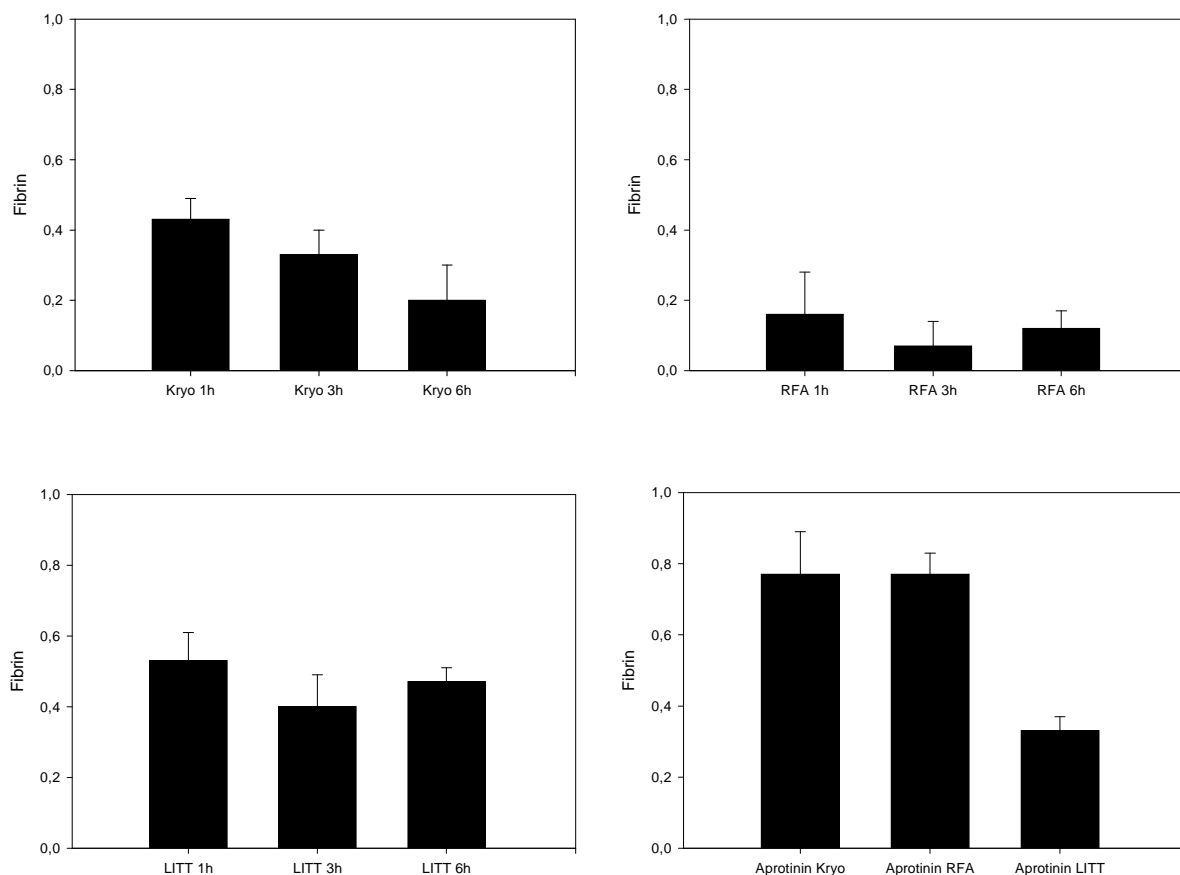


Abb. 18: Darstellung der Gefäße mit intravasalem Fibrin (Thema Gefäß b). Der obere linke Graph zeigt die Werte nach Kryoablation (Kryo), oben rechts kommt die RFA zur Darstellung und der Graph unten links zeigt die Ergebnisse nach LITT, jeweils nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden. Unten rechts kommt die Aprotininingruppe zur Darstellung, jeweils 3 Stunden nach Kryoablation, RFA und LITT.

4.5 Latente und aktive MMP-2- und MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation (Zymographien)

4.5.1 Latente MMP-2-Expression nach lokaler Tumorablation

In Abb. 19 wird die latente MMP-2-Expression in normalem Lebergewebe, Tumorrand und Tumorzentrum bei der Kontrollgruppe und den drei verwendeten Ablationsverfahren gezeigt. Die X-Achse stellt den Zeitpunkt der Probeentnahme nach durchgeführter Ablation dar. Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die Kontrollgruppe, die keiner Intervention zugeführt wurde.

Kontrollgruppe: Im Randgebiet des Tumors fiel eine signifikante Erhöhung der MMP-2-Expression des nichtbehandelten Tumorrandes im Vergleich zum normalen Lebergewebe auf. Im Tumorzentrum fiel ebenfalls ein signifikanter Anstieg der MMP-2-Expression sowohl im Vergleich zum normalen Lebergewebe als auch zum Randgewebe auf.

Kryotherapie: Im normalen Lebergewebe zeigte sich im Zeitverlauf keine signifikante Steigerung der latenten MMP-2-Expression. Es kam zu einer minimalen Erhöhung nach 6 Stunden. Im Randbereich führte die Therapie zu keinem signifikanten Anstieg der MMP-2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Zentrum des Tumors fiel auch nach Ablation eine weiter bestehende signifikante Erhöhung der MMP-2-Intensität im Vergleich zur normalen Leber und zum Tumorrand der Kontrollgruppe im Zeitverlauf auf, sechs Stunden nach Ablation allerdings nicht mehr signifikant.

RFA: Im normalen Lebergewebe kam es zu keinem deutlichen Anstieg der MMP-2-Expression während der Ablation. Im Randbereich des Tumors zeigte sich ein signifikanter Abfall der MMP-2-Expression während der RFA im Vergleich zu der schon oben erwähnten gesteigerten Expression vor Ablation. Im Tumorzentrum, also der Ablationszone, kam es im Vergleich zur Kontrolle im Zeitverlauf zu einem signifikanten Abfall der MMP-2-Intensität, nach drei Stunden sogar zu einer signifikanten Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle in Randgebiet und normalem Lebergewebe.

LITT: Nach Durchführung der LITT zeigte sich im normalen Lebergewebe keine Veränderung der MMP-2-Expression. Im Randgebiet kam es zu einem signifikanten Abfall der Intensität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das gleiche zeigte sich auch im Tumorzentrum. Hier fiel die Expression nach 6 Stunden nicht nur signifikant zur Zentrumskontrolle, sondern auch zu den Kontrollen des Randgewebes und des Normalgewebes.

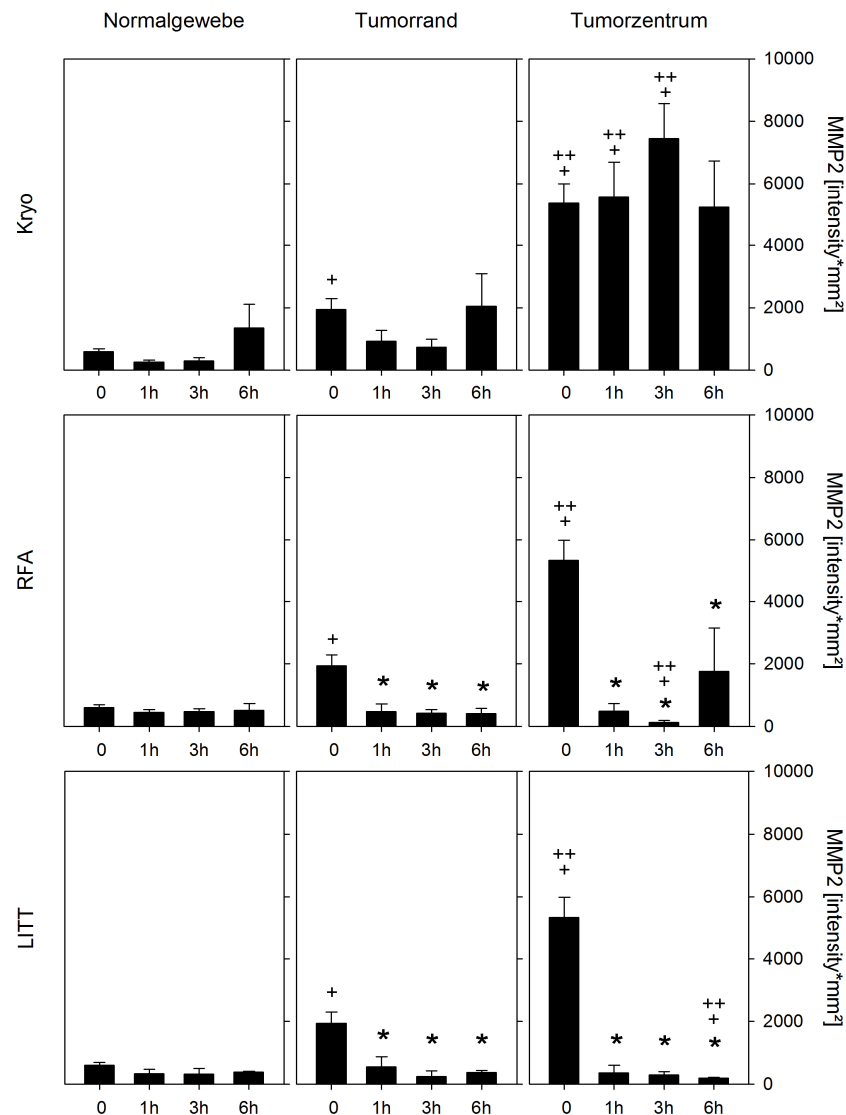


Abb. 19: Darstellung der latenten MMP-2 in Normalgewebe, Tumorrund und Tumorzentrum. Aufgeführt sind Kryoablation (Kryo), Radiofrequenzablation (RFA) und Laserablation (LITT). Auf der X-Achse kommt der Probeentnahmezeitpunkt zur Darstellung. 0 = Kontrollgruppe (keine Intervention). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: + = vs. Kontrolle Normalgewebe, ++ = vs. Kontrolle Randgewebe, * = vs. Kontrolle im jeweiligen Gewebe. Zunächst fiel in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der latenten MMP-2 sowohl im Randgewebe als auch im Tumorgewebe auf. Nach Kryoablation zeigte sich eine signifikante Steigerung der MMP-2-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Nach RFA kam es im Tumorzentrum zunächst zu einer signifikanten Verringerung der latenten MMP-2, nach 6 Stunden allerdings zu einem erneuten Anstieg. Die LITT führte zu einer signifikanten Reduktion der latenten MMP-2 sowohl im Randgewebe als auch im Tumorzentrum.

4.5.2 Aktive MMP-2-Expression nach lokaler Tumorablation

In Abb. 20 wird die aktive MMP-2-Expression in normalem Lebergewebe, Tumorrand und Tumorzentrum bei Kontrollgruppe und den drei verwendeten Ablationsverfahren gezeigt. Die X-Achse stellt den Zeitpunkt der Probeentnahme nach durchgeführter Ablation dar. Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die Kontrollgruppe, die keiner Intervention zugeführt wurde.

Kontrollgruppe: Die aktive MMP-2-Expression zeigte sich im normalen Lebergewebe und in der Tumorrandzone der Kontrollgruppe nahezu bei null, während eine signifikante Erhöhung im Bereich des Tumorzentrums zu erkennen war.

Kryotherapie: Im normalen Lebergewebe und in der Tumorrandzone kam es zu keiner wesentlichen Erhöhung der aktiven MMP-2-Expression während des zeitlichen Verlaufes. Im Tumorzentrum zeigte sich allerdings ein signifikanter Anstieg bereits nach einer Stunde im Vergleich zu Normalgewebe und Tumorrand der Kontrollgruppe. Nach drei Stunden stieg die Aktivität nochmals, allerdings nicht signifikant. Nach 6 Stunden zeigte sich ein Rückgang der MMP-2-Aktivität, die allerdings noch immer im Vergleich zu Normalgewebe und Tumorrand der Kontrolle signifikant erhöht war.

RFA: Im Gewebe des nichtbehandelten Leberlappens stieg die MMP-2-Aktivität nach einer Stunde bereits, allerdings nicht signifikant zur Kontrolle. Im Bereich des Tumorrandes kam es drei Stunden nach Ablation zu einem signifikanten Anstieg der aktiven MMP-2-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Nach sechs Stunden fiel die Aktivität erneut, und zwar signifikant zur angestiegenen Expression nach drei Stunden im Randgebiet. Im Tumorzentrum zeigte sich keine wesentliche Änderung der MMP-2-Aktivität, am ehesten deutete sich eine kleine Reduktion an.

LITT: Bei LITT kam es sowohl im normalen Lebergewebe als auch in der Tumorrandzone zu keinem signifikanten Anstieg der MMP-2-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Im Tumorzentrum war eher eine Verringerung der aktiven MMP-2 zu verzeichnen, allerdings nicht signifikant zur Kontrollgruppe.

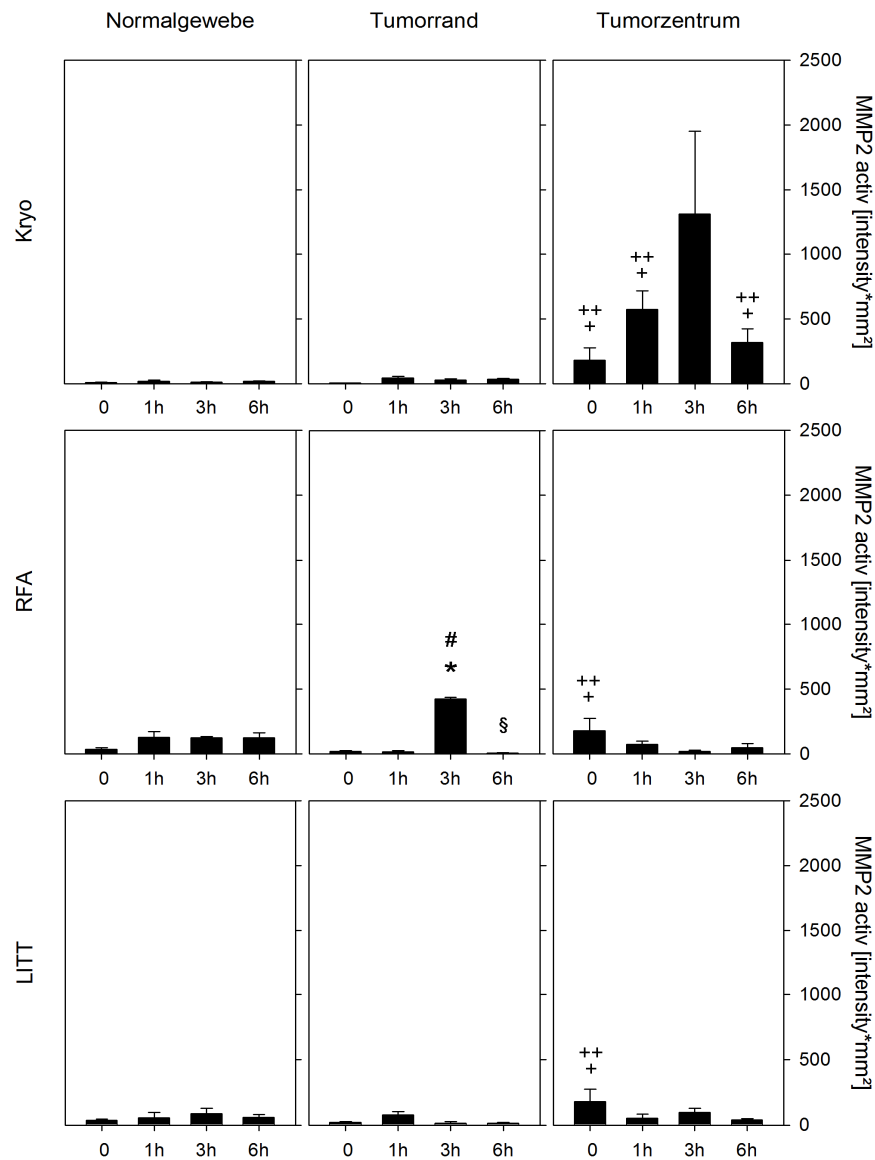


Abb. 20: Darstellung der aktiven MMP-2 in Normalgewebe, Tumorrand und Tumorzentrum. Aufgeführt sind Kryoablation (Kryo), Radiofrequenzablation (RFA) und Laserablation (LITT). Auf der X-Achse kommt der Probeentnahmezeitpunkt zur Darstellung. 0 = Kontrollgruppe (keine Intervention). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: + = vs. Kontrolle Normalgewebe, ++ = vs. Kontrolle Randgewebe, * = vs. Kontrolle im jeweiligen Gewebe, # = vs. Rand 1h RFA, § = vs. Rand 3h RFA. Zunächst fällt in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der aktiven MMP-2 im Tumorgewebe auf. Nach Kryoablation zeigt sich eine signifikante Steigerung der MMP-2 Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Nach RFA kommt es im Randgewebe nach 3 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der aktiven MMP-2, nach 6 Stunden allerdings zu einem Abfall. Nach LITT zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

4.5.3 Latente MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation

In Abb. 21 wird die latente MMP-9-Expression in normalem Lebergewebe, Tumorrand und Tumorzentrum bei Kontrollgruppe und den drei verwendeten Ablationsverfahren gezeigt. Die X-Achse stellt den Zeitpunkt der Probeentnahme nach durchgeführter Ablation dar. Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die Kontrollgruppe, die keiner Intervention zugeführt wurde.

Kontrollgruppe: Im Bereich der normalen Leber und des Tumorrandes fand sich keine erhöhte Expression von latenter MMP-9. Im Tumorzentrum zeigte sich allerdings ein zum Normalgewebe und zum Tumorrand signifikanter Anstieg der latenten MMP-9.

Kryotherapie: Nach Durchführung der Kryoablation kam es im Bereich des Normalgewebes und des Tumorrandes zu einem über den Zeitverlauf kontinuierlichen Anstieg der latenten MMP-9-Expression, allerdings nicht signifikant. Nach sechs Stunden war dennoch eine erhöhte Expression in beiden Geweben zu erkennen. Im Tumorzentrum zeigte sich bereits eine Stunde nach Ablation eine signifikante Erhöhung der latenten MMP-9 im Vergleich zum Normalgewebe und des Tumorrandes der Kontrollgruppe. Nach drei Stunden fand erneut ein Anstieg der MMP-9-Expression statt, der zusätzlich noch signifikant zum Tumorgewebe der Kontrollgruppe war. Nach sechs Stunden zeigte sich immer noch hohe latente MMP-9-Expression, allerdings nicht mehr signifikant.

RFA: Nach Radiofrequenzablation ließ sich im Bereich der normalen Leber nach 6 Stunden ein signifikanter Anstieg der latenten MMP-9-Expression im Vergleich zur Kontrolle und zu den Werten eine Stunde und drei Stunden nach Ablation erkennen. Die Expression im Randbereich zeigte keinen signifikanten Anstieg, nach sechs Stunden war jedoch ein Anstieg zu verzeichnen. Im Tumorzentrum fiel im Vergleich zur Kontrolle nach einer Stunde kein signifikanter Unterschied auf, nach drei Stunden kam es sogar zu einem nicht signifikanten Abfall der Expression, nach sechs Stunden zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung der latenten MMP-9-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

LITT: Die LITT schien keine Veränderung der MMP-9-Expression im Bereich des normalen Lebergewebes und der Tumorrandzone im Vergleich zur Kontrolle zu bewirken. Im Tumorzentrum selbst kam es sogar zu einer signifikanten Reduktion der latenten MMP-9-Expression im Vergleich zum Tumorgewebe der Kontrollgruppe.

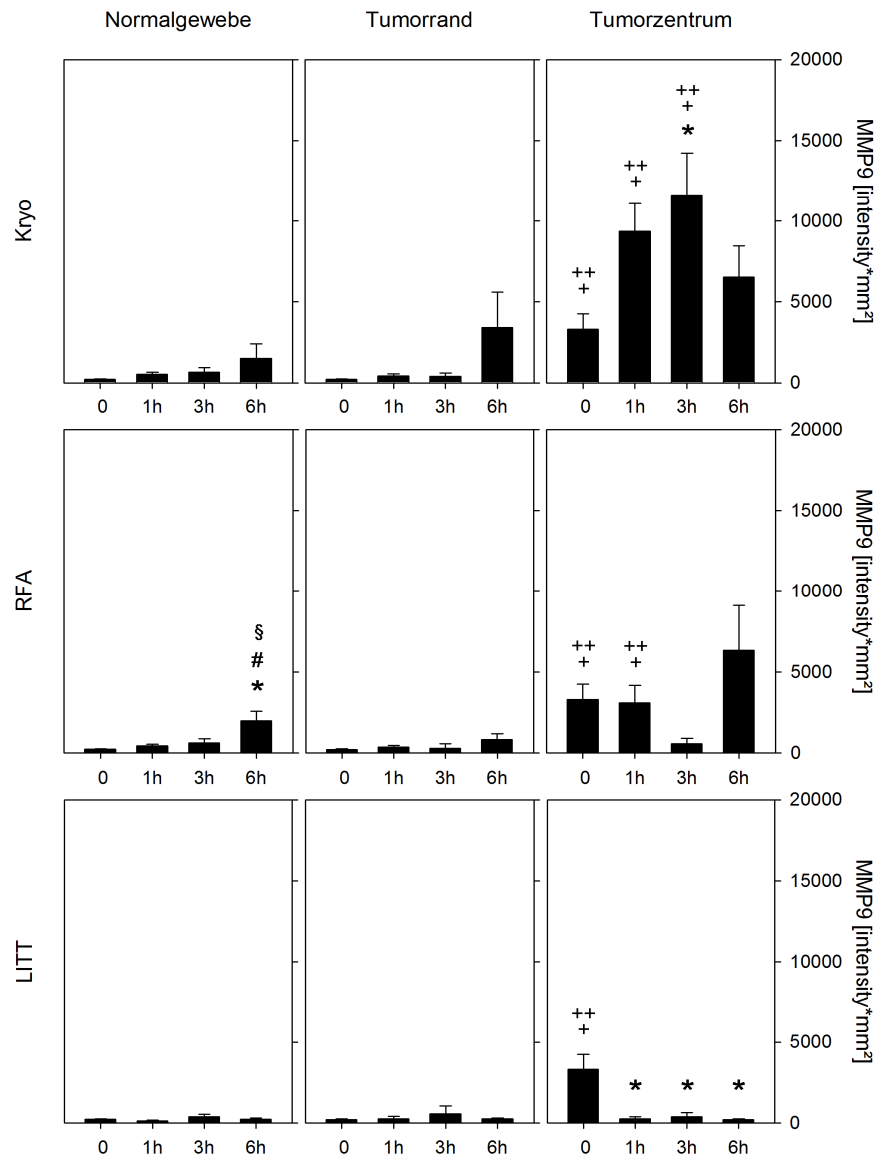


Abb. 21: Darstellung der latenten MMP-9-Expression in Normalgewebe, Tumorrand und Tumorzentrum. Aufgeführt sind Kryoablation (Kryo), Radiofrequenzablation (RFA) und Laserablation (LITT). Auf der X-Achse kommt der Probeentnahmezeitpunkt zur Darstellung. 0 = Kontrollgruppe (keine Intervention). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: + = vs. Kontrolle Normalgewebe, ++ = vs. Kontrolle Randgewebe, * = vs. Kontrolle im jeweiligen Gewebe, # = vs. 1h RFA Normalgewebe, § = vs. 3h RFA Normalgewebe. Zunächst fiel in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der latenten MMP-9 im Tumorgewebe auf. Nach Kryoablation zeigte sich eine signifikante Steigerung der MMP-9 Expression im Tumorgewebe sowie eine nicht signifikante Erhöhung im Randgewebe nach 6 Stunden. Nach RFA kam es im Normalgewebe nach 6 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der latenten MMP-9, im Tumorzentrum zeigte sich nach 3 Stunden zunächst eine Reduktion, nach 6 Stunden allerdings erneut eine Steigerung. Nach LITT kam es im Tumorgewebe zur signifikanten Verringerung der latenten MMP-9.

4.5.4 Aktive MMP-9-Expression nach lokaler Tumorablation

In der Abbildung 22 wird die aktive MMP-9-Expression in normalem Lebergewebe, Tumorrand und Tumorzentrum bei der Kontrollgruppe und den drei verwendeten Ablationsverfahren gezeigt. Die X-Achse stellt den Zeitpunkt der Probeentnahme nach durchgeführter Ablation dar. Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die Kontrollgruppe, die keiner Intervention zugeführt wurde.

Kontrollgruppe: Zwischen normalem Lebergewebe und der Tumorrandzone gab es keinen signifikanten Unterschied. Die aktive MMP-9-Expression war im Tumorzentrum im Vergleich zu Normalgewebe und Tumorrandzone erhöht, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

Kryotherapie: Im normalen Lebergewebe und im Tumorrand fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu den aktiven MMP-9-Expressionen der Kontrollgruppe im Zeitverlauf. Im Tumorrandgewebe schien es zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung ab einer Stunde nach Ablation zu kommen. Im Tumorzentrum zeigte sich ein signifikanter Anstieg der aktiven MMP-9 bereits nach einer Stunde im Vergleich zum normalen Lebergewebe und zum Tumorrandgewebe der Kontrollgruppe. Nach drei Stunden fand sich ein erneuter Anstieg der zusätzlich auch signifikant zur aktiven MMP-9-Expression im Tumorgewebe der Kontrollgruppe war. Nach sechs Stunden fiel die Expression wieder ab, war allerdings noch signifikant zu Normalgewebe und Randgewebe der Kontrollgruppe erhöht.

RFA: Nach durchgeführter RFA kam es im Gewebe der normalen Leber zu einem Anstieg der aktiven MMP-9-Expression, allerdings nicht signifikant. In der Tumorrandzone schien zunächst die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht zu steigen, fiel aber nach drei und sechs Stunden ab. Im Tumorzentrum kam es nach einer Stunde zu einer nicht signifikanten Steigerung der MMP-9-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Nach drei und sechs Stunden fiel diese allerdings wieder auf vergleichbare Werte der Kontrollgruppe ab.

LITT: Im normalen Lebergewebe kam es drei Stunden nach LITT zu einer nicht signifikanten Erhöhung der aktiven MMP-9-Expression, die allerdings nach sechs

Stunden wieder abfiel. Im Tumorrandgebiet zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Expression im Randgewebe der Kontrollgruppe. Auch im Tumorzentrum kam es zu keinen signifikanten Unterschieden, nach einer Stunde und nach sechs Stunden schien die aktive MMP-9-Expression sogar im Vergleich zur Kontrolle verringert zu sein.

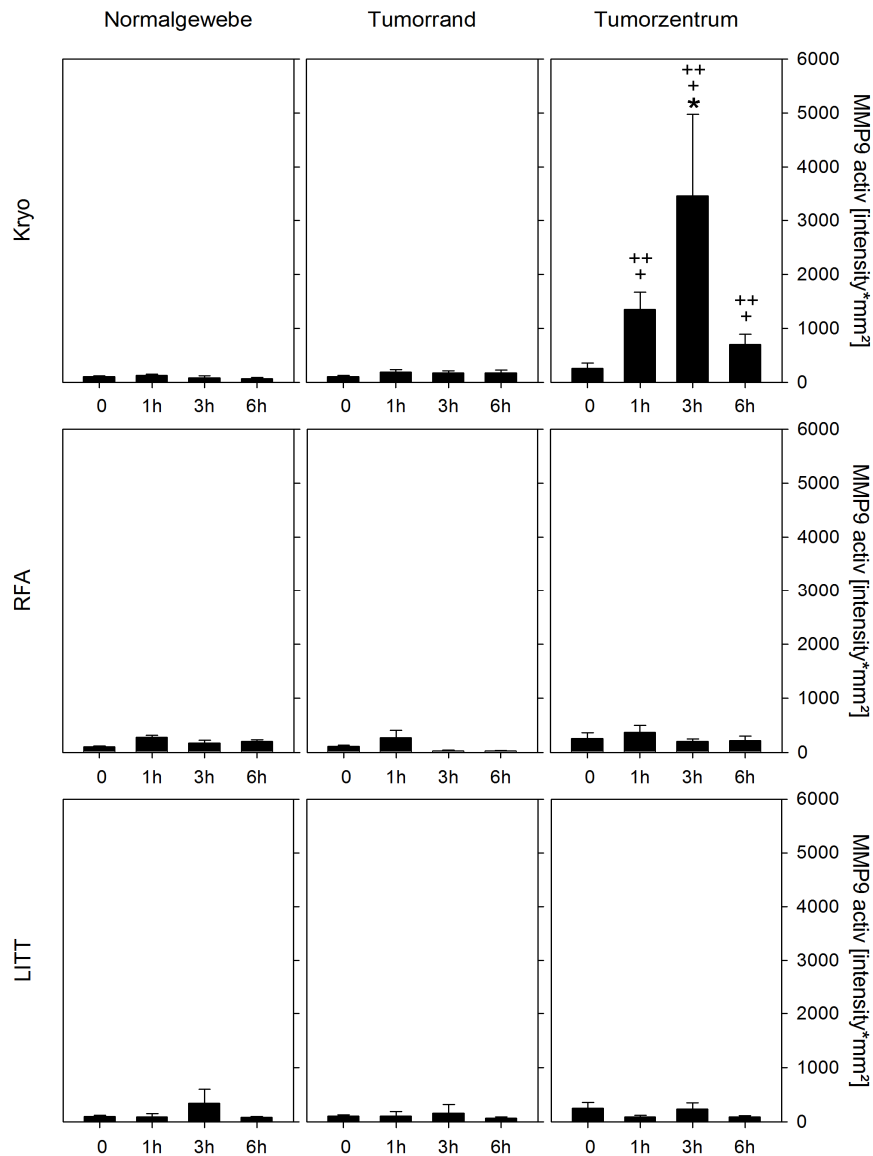


Abb. 22: Darstellung der aktiven MMP-9-Expression in Normalgewebe, Tumorrand und Tumorzentrum. Aufgeführt sind Kryoablation (Kryo), Radiofrequenzablation (RFA) und Laserablation (LITT). Auf der X-Achse kommt der Probeentnahmezeitpunkt zur Darstellung. 0 = Kontrollgruppe (keine Intervention). Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: + = vs. Kontrolle Normalgewebe, ++ = vs. Kontrolle Randgewebe, * = vs. Kontrolle im jeweiligen Gewebe. In der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Erhöhung der aktiven MMP-9 in Randgewebe und Tumorgewebe. Nach Kryoablation zeigte sich eine signifikante Steigerung der aktiven MMP-9 Expression im Tumorgewebe nach 3 Stunden, allerdings nach 6 Stunden wieder abfallend. Nach RFA und LITT kam es in allen Geweben zu keiner signifikanten Steigerung der aktiven MMP-9.

4.5.4 MMP-Expression nach Inhibition durch Aprotiningabe und lokaler Tumorablation

In Abb. 23 wird die jeweilige MMP-Expression (MMP-2, aktive MMP-2, MMP-9 und aktive MMP-9) in Tumorrandgewebe und Tumorzentrum drei Stunden nach Ablation mit vorheriger Aprotiningabe dargestellt. Als Vergleichskontrolle diente das jeweilige Gewebe drei Stunden nach Ablation ohne vorherige Aprotininapplikation. Die Diagramme sind nach den drei verwendeten Ablationsverfahren geordnet.

MMP-2-Expression: Nach Durchführung der Kryoablation kam es im Tumorrandgewebe zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion der MMP-2-Expression durch Aprotinin. Im Tumorzentrum zeigte sich ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion der MMP-2-Expression durch Aprotinin, beide waren jeweils signifikant zu den Tumorrandgeweben erhöht. Drei Stunden nach RFA zeigte sich bei beiden Gruppen im Tumorrand kein signifikanter Unterschied. Im Tumorzentrum zeigte sich keine Reduktion der MMP-2-Expression, sondern ein zur Kontrolle signifikanter Anstieg der Expression. Nach LITT fand sich weder in Tumorrand noch in Tumorzentrum ein signifikanter Unterschied, die MMP-2-Expression schien in beiden Geweben leicht vermindert zu sein.

Aktive MMP-2-Expression: Drei Stunden nach durchgeführter Kryoablation zeigte sich im Tumorrandgewebe eine nicht signifikante Reduktion der aktiven MMP-2-Expression. Im Tumorzentrum allerdings kam es zu einer nicht signifikanten Erhöhung nach Aprotiningabe im Vergleich zur Ablation ohne Aprotininapplikation. Im Vergleich zum Tumorrandgewebe nach Aprotiningabe war die aktive MMP-2-Expression signifikant erhöht. Nach durchgeführter RFA zeigte sich im Tumorrandgewebe eine signifikante Reduktion der aktiven MMP-2-Expression durch Aprotiningabe. Im Tumorzentrum war dieser Effekt nicht nachzuweisen, hier kam es sogar zu einer signifikanten Erhöhung der aktiven MMP-2-Expression im Vergleich zum abladierten Gewebe ohne Aprotininapplikation. In den LITT-Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

MMP-9-Expression: Nach Durchführung der Kryoablation zeigte sich im Tumorrandgewebe kein signifikanter Unterschied zwischen der MMP-9-Expression mit und ohne Aprotininapplikation. Im Tumorzentrum dagegen wurde die Expression reduziert, allerdings nicht signifikant. Nach Aprotiningabe war die MMP-9-Expression im Tumorzentrum nach wie vor signifikant erhöht gegenüber der Expression im Tumorrandgewebe nach Aprotininapplikation. In den Gruppen der RFA und LITT waren jeweils keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Aktive MMP-9-Expression: Drei Stunden nach durchgeführter Kryoablation kam es im Tumorrandgebiet zu einer signifikanten Reduktion der aktiven MMP-9-Expression durch die vorherige Gabe von Aprotinin. Im Zentrum zeigte sich ebenfalls eine Reduktion, allerdings nicht signifikant. Gegenüber dem Randgewebe mit vorheriger Aprotininapplikation war die aktive MMP-9-Expression noch signifikant erhöht. In den beiden Gruppen RFA und LITT waren keine signifikanten Unterschiede durch Aprotiningabe zu erkennen.

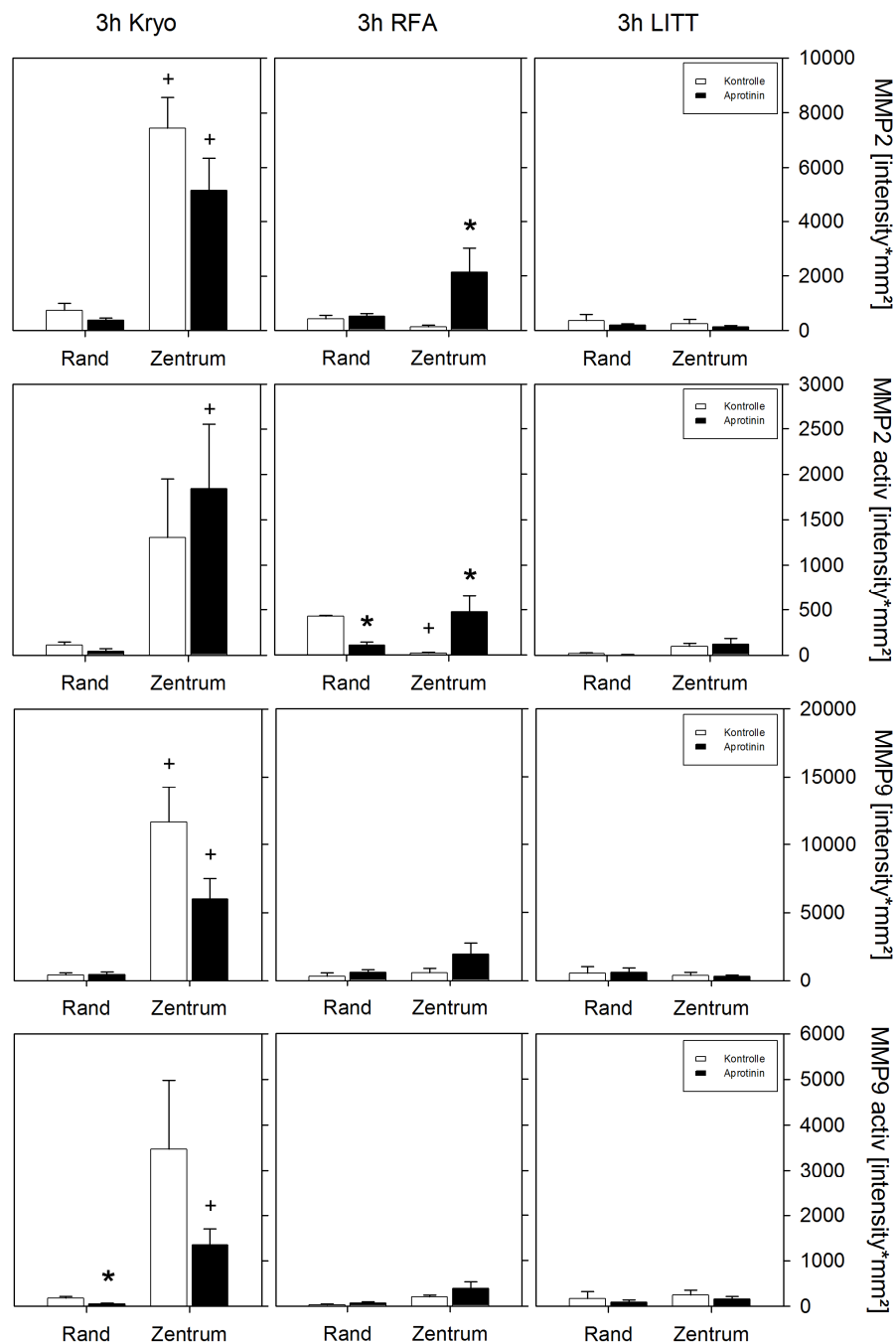


Abb. 23: Darstellung der MMP-2 und 9 in Tumorrand und Tumorzentrum 3 Stunden nach der jeweiligen Intervention (Kryoablation, Radiofrequenzablation und LITT) und vorheriger Aprotininapplikation. Die Signifikanzen werden wie folgt gekennzeichnet: + = vs. Rand, * = vs. Kontrolle. Es zeigte sich nach Kryotherapie eine zum Teil signifikante Verringerung der MMP-2- und 9-Expression vor allem im Randbereich der Ablation. Nach RFA und LITT konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Methoden der tierexperimentellen Tumorablation in der Leber

Die Kryoablation wurde an die Tumorgröße angepasst. In Vorversuchen wurde die Läsion bei verschiedenen langen Gefrierzeiten ausgemessen. Wie in der Literatur empfohlen, wurde eine zweifache Gefrierphase mit einer intermittierenden Auftauphase bis -30 °C durchgeführt.

Im Vergleich zu den hyperthermen Verfahren zeigten sich bei der Kryotherapie in der Auftauphase schwere Einblutungen, da es durch die Kolliquationsnekrose nicht zu einer Gefäßokklusion kommt. Die intra- und postoperative Letalität war in der hier gezeigten Arbeit mit 4 Tieren im Vergleich zu den hyperthermen Verfahren hoch. Dies kann an den vielfältigen Komplikationen der Kryotherapie liegen, wie z.B. Arrhythmien, akute Niereninsuffizienz und das mehrfach beschriebene Kryoschock-Phänomen (ein Multiorganversagen einhergehend mit einer intravasalen disseminierten Koagulopathie) [28;87;108;145]. Aus diesem Grund ziehen die meisten Anwender zurzeit die hyperthermen Verfahren der Kryotherapie vor [104;148].

Im Gegensatz zur Kryotherapie entsteht durch die Radiofrequenzablation eine Koagulationsnekrose. Es werden Temperaturen zwischen 60°C und 100°C erreicht. Um einen Karbonisationseffekt um die Sonde zu verhindern, wird diese intern gekühlt. Bei Temperaturen über 90°C kommt es allerdings zu einer Verkochung. Dies bedingt eine gleichzeitige Erhöhung der Impedanz, eine Reduktion des Stromflusses und eine Minderung der applizierten Energie [104]. Bei dem Versuchsmodell in dieser Arbeit wurden die Impedanz und der Stromfluss nach einer Minute gemessen. Der Widerstand lag im Mittel bei 343,77 (\pm 21,39) Ω und der Stromfluss bei 0,16 (\pm 0,01) Ampere. Es kam zu keinen großen Schwankungen der Impedanz und des Stromflusses.

In der Literatur werden Läsionsgrößen von 1 cm bis zu 5 cm beschrieben [16;25;44;104;133]. Die RFA geht mit einer geringen intraoperativen und postoperativen Komplikationsrate einher, so dass die Radiofrequenzablation zurzeit das am meisten verwendete Ablationsverfahren darstellt. In der hier gezeigten Arbeit traten im Gegensatz zur Kryoablation perioperativ und postoperativ keine letalen Komplikationen auf.

Nach der RFA stellt die Laserinduzierte Ablation das klinisch am zweithäufigsten verwendete Verfahren dar und ist in Hinblick auf die Komplikationsrate mit der Radiofrequenzablation vergleichbar [30]. In der hier gezeigten Arbeit hatte die Therapie allerdings in 4 Fällen letale Folgen.

Eickmeyer et al. konnten zeigen, dass Metastasen mit einem Durchmesser über 4 cm nicht adäquat mittels LITT behandelt werden konnten [30].

Nach verschiedenen Vorversuchen und Messungen der Läsionen ergaben sich für die hier beschriebene Studie eine Therapielänge von 5 min. und eine Leistung von 4 Watt. Die perioperativ gemessene Leistung zeigte keine großen Schwankungen im Vergleich zur voreingestellten Watt-Zahl (3,53 ($\pm 0,05$) Watt). Es ließen sich Läsionen von im Mittel 11,1 ($\pm 0,37$) mm erreichen und somit ausreichend, um eine vollständige Destruktion des Tumorgewebes zu erlangen.

5.2 Methode der Zymographie zur MMP-Bestimmung

Bei den Gewebsementnahmen zeigten sich bei den hyperthermen Verfahren, v.a. bei der laserinduzierten Ablation, in einzelnen Fällen Schwierigkeiten, Gewebe aus der Läsionszone zur Proteinbestimmung zu gewinnen, da hierfür eine bestimmte Größe notwendig war.

Die Zymographie ist eine der häufigsten Methoden, um die MMP-2- und MMP-9-Expression darzustellen. Diese sensitive Methode ermöglicht es weiterhin, aktiviertes Zelllysate ohne die Verwendung von Antikörpern oder radioaktiv markierter Materialien nachzuweisen. Der Nachteil liegt allerdings darin, dass nicht zwischen freien und in Komplexen gebundenen MMP's unterschieden werden kann. Da trotz einer Kühlung von -80°C die Zelllysate im Verlauf degradieren, wurde darauf geachtet, dass die Zymographien zeitnah durchgeführt wurden, da es sonst zu Verfälschungen der Ergebnisse kommen kann. Weitere Fehlerquellen liegen in den komplexen Zwischenschritten dieser Methode. Es war vor allem darauf zu achten, dass die frischen Gewebeproben bei der Zerkleinerung adäquat gekühlt wurden und es nicht aufgrund einer zu hohen Temperaturentwicklung zu nicht erwünschten Reaktionen kam. Weiterhin ist es von enormer Wichtigkeit, die pH-Werte genauestens einzuhalten, da Schwankungen zu einem falschen Ergebnis führen. Die verwendeten Flüssigkeitsmischungen wurden daher vor jedem Gebrauch auf den pH-Wert

überprüft. Auch während der Laufphase der Gele sollte ein einheitlicher pH-Wert eingestellt sein und die Temperatur konstant niedrig gehalten werden. Daher wurde darauf geachtet, dass die eingestellte Spannung bestimmte Werte nicht überschritt und die Gelkammern extern mittels Eis gekühlt wurden. Während der Aktivierungsphase im Substratpuffer wurde darauf geachtet, dass eine konstante Temperatur bei 37°C eingestellt war, da es nur so zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich der Aktivierung kommt. Da die zunächst weichen Gele durch eine Trocknung fest werden, kann es unter Umständen passieren, dass diese sich wellen und somit nicht mehr auswertbar sind. Es wurden immer Fotos bereits im weichen Zustand erzeugt und die Trocknung erfolgte unter Kompression, so dass diese Fehlerquelle minimiert wurde.

5.3 Ausmaß und Qualität der Gewebedestruktion durch Kryo, RFA und LITT

Durch die hypotherme Ablation mittels der Kryosonde entsteht eine komplette Kolliquationsnekrose des Tumor- und Lebergewebes. Diese ist gekennzeichnet durch eine schon makroskopisch sichtbare Ödembildung im Randbereich, durch hyperchromatische Kerne und eine verstärkte zytoplasmatische Eosinophilie. Die hypotherme Ablation bewirkt ein progressives Abschalten des Zellmetabolismus, während der Gefrierphase kristallisiert sich Wasser extrazellulär und erzeugt ein hyperosmotisches Umfeld, das mit Einhergehen von Elektrolytverschiebungen zur Zerstörung der Zellstrukturen führt [41]. Die Azinusstruktur im Zentrum war weitestgehend zerstört, im Randgebiet nur teilweise. Während in der marginalen Zone die intralobuläre Balkenstruktur meist noch erhalten war, fiel in der Ablationszone eine fast vollständige Aufhebung der Struktur auf. Um den Zelltod zu evaluieren, eignen sich vor allem die Zellkernstrukturen. Pyknische und dunkle Zellkerne zeigten sich vor allem im Zentrum der Ablation, in der Randzone, wo nur noch Temperaturen von 0–40°C erreicht werden [41], waren die Zellkerne noch zu nahezu 50% erhalten. Wie schon in mehreren Studien beschrieben, bilden sich auch intrazellulär Eisformationen, die allermeist zum vollständigen Zelltod führen [75-77;84;103;127]. Interessanterweise fanden sich drei und sechs Stunden nach Ablation mehr zerstörte Zellkerne im Zentrum als bereits nach einer Stunde. Wie

bereits durch Kollmar et al. beschrieben, kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Zellen die Behandlung überleben und somit zu einer erhöhten Remetastasierungsrate nach Kryotherapie führen [61].

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es histomorphologisch durch die Kryoablation zu einer nahezu vollständigen Zerstörung der Zellen im Zentrum kam. Weiterhin ist eine Randzone zu erkennen, in der noch teilweise erhaltene Zellstrukturen und nur ca. 50% apoptotische Zellen zu finden waren. Dies deckt sich mit den morphologischen Beobachtungen bereits veröffentlichter Arbeiten [41;61;110].

Die hypertherme Radiofrequenzablation erzeugt zwei histomorphologische Zonen. Im Zentrum der Hitzeeinwirkung entsteht eine Koagulationsnekrose, während die Randzone durch vermehrte Einblutung und Apoptose gekennzeichnet ist [9;56;64;86;107;132;134]. Die Apoptose wird wahrscheinlich durch Temperaturen zwischen 40°C und 45°C initiiert [11;12]. Da die fokale Hyperthermie einen Temperaturgradienten erzeugt, der sich progressiv vom Zentrum zur Peripherie verringert, findet in der Randzone vermehrt Apoptose im Gegensatz zur Nekrosenbildung im Zentrum statt [90]. In diesem fanden sich nur noch vereinzelt eine intakte lobuläre Balkenstruktur und Azinusstruktur, die Zellstrukturen waren weitestgehend aufgehoben, es waren nur noch wenige intakte Zellkerne zu erkennen, dies allerdings eher in Richtung der Randzone. Durch eine Denaturierung der zellulären Proteine und der Zellmembranen entsteht das typische Bild der Koagulationsnekrose. Die Zellkerne färben sich zumeist dunkel an und sind pyknisch. In diesem Bereich werden die Zellen aufgrund der Nekrose zerstört. In der Randzone zeigten sich ebenfalls pyknische und dunkle Zellkerne, allerdings weniger ausgeprägt als im Zentrum. In dieser Arbeit wurde nur eine HE-Färbung durchgeführt, so dass eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose nicht durchgeführt wurde. Weiterhin ist sehr wahrscheinlich eine apoptotische Reaktion eher zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar (meist 24 Stunden), so dass eine Probeentnahme nach einer bis sechs Stunden noch keine signifikante Aussage treffen kann. Laut der Literatur ist davon auszugehen, dass sich in der Randzone eher apoptotischer Zelltod abspielt. Wesentlich deutlicher in der Randzone zu erkennen war eine signifikant erhöhte Anzahl an Erythrozyten im Vergleich zum Ablationszentrum. Die vermehrte Einblutung stellte sich bereits eine Stunde nach Ablation dar und verringerte sich nicht nach sechs Stunden. Aus diesem Grund wird die Randzone in der Literatur auch als hämorrhagische Zone bezeichnet [64;86;132;134].

Diese Arbeit zeigt histomorphologisch die bereits vorbeschriebenen Zonen bei Radiofrequenzablation. Interessanterweise bestand bereits eine Stunde nach Ablation eine wesentliche Einblutung in der Randzone, die sich auch innerhalb der ersten sechs Stunden nicht zurückbildet. Im Vergleich zum Zentrum zeigte sich in dieser hämorrhagischen Zone ein verringerter Anteil an nekrotischen Zellen. Eine späte indirekte Reaktion durch Apoptose ist in der Literatur beschrieben, so dass die Randzone als Sicherheitszone angesehen wird und eventuell die Möglichkeit einer Remetastasierung unterbindet [137].

Auch die Laserablation führt wie die Radiofrequenzablation zu einer Koagulationsnekrose im Zentrum. Dabei zeigte sich, wie schon in der Literatur vorbeschrieben, eine komplette, gut abgrenzbare Nekrosezone, die von einer faserigen Randzone umrandet wird [91]. Azinus- und intralobuläre Balkenstrukturen waren nicht mehr zu erkennen, und es zeigten sich im Wesentlichen keine intakten Hepatozyten mehr. Aufgrund der kompletten Zerstörung durch die Nekrose kam es erst sechs Stunden nach Ablation zu einer minimalen Einblutung ins Ablationszentrum im Vergleich zur Randzone, in der sich bereits nach einer Stunde vermehrt Erythrozyten fanden. Die Randzone selbst war wie schon bei der Radiofrequenzablation durch eine verringerte Zellzerstörung gekennzeichnet. Auch hier ist davon auszugehen, dass sich eine progrediente Apoptose als indirekte Spätreaktion einstellt.

Diese Arbeit zeigt, dass beide Formen der hyperthermen Ablation in verschiedene Zonen eingeteilt werden können. Im Zentrum kam es zu einer direkten Zellzerstörung durch Koagulationsnekrosen, während es in der Randzone wahrscheinlich zu einer indirekten Zellreaktion einhergehend mit Apoptose kam. Bei beiden Verfahren stellte sich bereits innerhalb von einer Stunde eine erhöhte Einblutung im Randgebiet ein. Bei der LITT entstand im Vergleich zur RFA eine fulminantere Nekrose, die scharf zum umliegenden Gewebe begrenzt war.

5.4 Einfluss von Kryo, RFA und LITT auf die MMP-2- und MMP-9-Expression nach Tumorablation in der Leber

Wie schon in vielen Studien beschrieben, zeigt auch diese Arbeit eine erhöhte MMP-2- und MMP-9-Expression im Tumorgewebe. Im Vergleich zum normalen Lebergewebe kam es im Tumorgewebe zu einer signifikanten Erhöhung der latenten Formen der MMP's, die aktive Form war allerdings nur bei MMP-2 im Vergleich zum normalen Lebergewebe signifikant erhöht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Waas et al. [142], in deren Untersuchungen die aktive Form der MMP-2 gegenüber der aktiven Form der MMP-9 im Tumorgewebe deutlich erhöht war. Daraus schließen Waas et al., dass MMP-2 die effektivere Protease im Metastasierungsprozess sein könnte und begründen diese Divergenz in der unterschiedlichen Regulierung der beiden Proteasen.

Sehr unterschiedlich sind die Angaben über mögliche prognostische Aussagen der erhöhten MMP-Aktivitäten. Baker et al. [10] beschrieben eine Korrelation zwischen MMP-9-Expression und Tumorstadium, diese Auffassung teilen auch mehrere Arbeiten [67;150;151]. Andere Studien zeigten eine Korrelation zwischen der MMP-9-Expression und dem Tumorstadium des Magenkarzinoms [29;69;152]. Wiederum Emara et al. [32] und andere Studien zeigten keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP's und dem Tumorstadium [70;94;99]. Adachi et al [3] konnten nachweisen, dass die erhöhte MMP-Expression zu einer vermehrten Rezidivrate führt. In einer Untersuchung von Ambiru et al. [8] zeigte sich eine erhöhte Typ-IV Kollagenasenaktivität (z.B. MMP-2 und MMP-9) bei Patienten, die ein Tumorrezidiv aufwiesen im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv. Zhou et al. sehen in der MMP-2-Expression einen Risikofaktor bezüglich der Rezidivrate und der Überlebensrate bei Patienten mit chirurgisch behandeltem Kolonkarzinom [153]. So muss davon ausgegangen werden, dass die vermehrte Aktivierung von MMP's in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose bei kolorektalen Lebermetastasen steht. Ke et al. konnten 2010 im Tierversuch zeigen, dass überlebende Tumorzellen nach insuffizienter Radiofrequenzablation unter anderem MMP-9 überexprimieren und es so möglicherweise zu einer rapiden Progression der verbliebenen Tumorzellen kommt [58]. Nachdem schon Frich et al. [39] eine erhöhte MMP-Aktivierung nach Radiofrequenzablation nachweisen konnten, war es die Intention

dieser Arbeit, als erste Studie die drei gängigsten Ablationsverfahren hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die MMP-Expression im Tiermodell zu untersuchen.

Drei Stunden nach der Kryoablation zeigte sich im Tumorzentrum eine erhöhte Expression von MMP-2, aktivierter MMP-2, MMP-9 und signifikant eine Erhöhung der aktivierten MMP-9. Nach insgesamt 6 Stunden fielen die jeweiligen MMP-Expressionen ab, blieben jedoch über dem Niveau der Kontrollgruppe. Dies lässt den Schluss zu, dass die Therapie mittels Kryoablation zu einer verstärkten Expression der MMP's im Bereich des verbliebenen Tumorzentrums führt. Es kann davon ausgegangen werden, dass es in den restlichen Metastasenzellen zu einer erhöhten MMP-Aktivierung kommt. Die erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im Bereich des Tumorgewebes ergibt sich ebenfalls aus der Reaktion der umliegenden Stromazellen, so dass es eher zu Tumorwachstum und Invasion kommt [23;78]. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, durch welche Zellen diese erhöhte MMP-Expression herbeigeführt wurde. Denkbar ist ebenfalls eine verstärkte Einwanderung von MMP-produzierenden Zellen, z.B. Makrophagen, durch die entstandene inflammatorische Reaktion. Um dies zu untersuchen, müsste eine Immunhistologie durchgeführt werden. Betrachtet man das umliegende Lebergewebe, ließ sich auch sechs Stunden nach Ablation kein signifikanter Unterschied der MMP-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit dem gewählten Zeitpunkt der Probeentnahme zusammen, da eine Reaktion der Randzone laut der Studienlage erst später zu erwarten ist. Allerdings ließ sich erkennen, dass die Expression der latenten Form der MMP-2 und der MMP-9 sechs Stunden nach Ablation im Randgebiet sowie auch im nicht betroffenen Lebergewebe stieg. Diese Unterschiede waren nicht signifikant, zeigten aber eine Tendenz, so dass man erwarten kann, dass es im weiteren Verlauf zu einer signifikanten Steigerung der latenten MMP-Formen und eventuell sogar zu einer vermehrten Aktivierung kommt. Dies sollte in nachfolgenden Studien mit verlängerter Probeentnahmezeit untersucht werden.

Nach Radiofrequenzablation zeigte sich insgesamt eher eine Verringerung der MMP-2- und MMP-9-Expression. Einzige Ausnahme bildete die aktive Form der MMP-2, die drei Stunden nach Radiofrequenzablation in der Randzone signifikant erhöht war, allerdings nach insgesamt sechs Stunden wieder abfiel. Weiterhin fiel eine signifikant vermehrte Expression von latenter MMP-9 sechs Stunden nach Ablation im Normalgewebe der Leber auf. Im Bereich des abladierten Tumors sank die MMP-2-

und MMP-9-Expression nach drei Stunden deutlich, nach sechs Stunden stieg sie allerdings wieder an, aber erreichte dabei nicht den Wert der Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse decken sich nicht vollständig mit den Schlussfolgerungen von Frich et al. [39], allerdings sollte man bedenken, dass die Probeentnahme bei der zitierten Studie vier Tage nach Ablation erfolgte. Wenn davon auszugehen ist, dass es wie bereits nachgewiesen, vier Tage nach Radiofrequenzablation in der Randzone und wahrscheinlich auch im nicht betroffenen Lebergewebe zur Erhöhung der MMP-2- und MMP-9-Expression und Aktivierung dieser Proteasen kommt, so lag sehr wahrscheinlich der Entnahmezeitpunkt in dieser Studie etwas zu früh, um valide Aussagen darüber machen zu können. Weiterhin sollte bedacht werden, dass Frich et al. [39] die MMP-Expressionen des abladierten Tumorgewebes und Randgewebes mit denen des normalen Lebergewebe und nicht mit der unabladierten Lebermetastase verglichen. Wenn man dahingehend in dieser Studie die Ergebnisse vergleicht, kommt man zu dem Schluss, dass sechs Stunden nach Radiofrequenzablation eine Erhöhung der MMP-2- und MMP-9-Expression im Vergleich zum normalen Lebergewebe zu erkennen war, allerdings bis zu diesem Zeitpunkt weniger hoch als in der unabladierten Lebermetastase. Trotzdem sollte bedacht werden, dass im Gegensatz zur Kolliquationsnekrose der Kryoablation durch die RFA eine Koagulationsnekrose hervorgerufen wird, die dennoch keine vollständige Inaktivierung der MMP's erreicht.

Bereits eine Stunde nach LITT zeigte sich im abladierten Tumor eine signifikante Verringerung der latenten MMP-2 und MMP-9 im Vergleich zum nichtabladierten Tumor. Nach drei, bzw. sechs Stunden blieben die Expressionen auf gleichem Niveau. Konsekutiv fanden sich auch keine vermehrten Expressionen aktivierter MMP-2 und MMP-9. Auch im Tumorrandbereich kam es zu keiner Steigerung der MMP-Expression, die latente MMP-2-Intensität war sogar signifikant zur Kontrolle gesunken. Bisher sind keine Untersuchungen zur MMP-Expression nach LITT durchgeführt worden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die LITT innerhalb der ersten sechs Stunden zu keiner Erhöhung der MMP's führte, sondern umgekehrt sogar zu einer signifikanten Verringerung. Ob es im weiteren Verlauf zu einer Steigerung kommen könnte, lässt sich nicht beurteilen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass zunächst durch die laserinduzierte Koagulationsnekrose jegliche MMP-Aktivierung unterbunden wird, allerdings ist nicht auszuschließen, dass es im weiteren Verlauf zu einer sekundären inflammatorischen Reaktion und damit zum

Einwandern von MMP-produzierenden Zellen (z.B. Makrophagen) kommt. Bislang wurde einzig die Nekrosegröße im Zeitverlauf untersucht. Diese scheint laut Nikfarjam et al. und Kühn et al. innerhalb von drei Tagen progredient zu sein. Ob es während dieser Größenzunahme letztendlich doch zu einer MMP-Aktivierung kommt oder diese ganz unterbunden werden kann, müsste in weiteren Studien untersucht werden [63;89].

5.5 Auswirkung der MMP-Inhibition durch Aprotinin auf die MMP-2- und MMP-9-Expression nach Tumorablation in der Leber

Aprotinin ist eine aktive Substanz und ein spezifischer Inhibitor der Serin Proteasen Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin. Eine Eigenschaft ist die Neutralisation der fibrinolytischen Aktivität von Plasmin und die Inhibition von plasminogenen Aktivatoren, die einen fibrinolytischen Effekt auslösen. Aprotinin bindet mit diesen Enzymen einen Komplex und besetzt so den Platz der aktiven Serine, um so eine Inhibition des fibrinolytischen und kininopoetischen Systems zu erreichen. Weiterhin reguliert Aprotinin als Serine Protease Inhibitor die Konzentrationen und Aktivitäten der MMP's, indem unter anderem der Plasminaktivierungsweg der MMP's geblockt wird [14;19;22;26;105;115]. Bereits Kollmar et al. konnten 2004 im Tierversuch zeigen, dass Aprotinin das mit der Kryoablation assoziierte Thrombozyten-Trapping inhibiert und die Gewebedestruktion verbessert, so dass möglicherweise bei Einsetzen des Medikamentes während der Kryoablation das Ergebnis verbessert und die Rezidivrate verringert werden kann [60]. In dieser Arbeit zeigte sich zumindest nach Durchführung der Kryotherapie eine zum Teil signifikante Verringerung der MMP-2- und MMP-9-Expression vor allem im Randbereich der Ablation. Nach RFA und LITT konnte dieser Effekt hier nicht nachgewiesen werden. Allein die Expression der aktiven MMP-2 war im Randbereich nach RFA und vorheriger Gabe von Aprotinin signifikant verringert. Möglicherweise wäre der inhibierende Effekt sechs Stunden oder noch länger nach Ablation deutlicher nachzuweisen. Ein anderer Ansatz für neue Studien wäre die Verwendung von spezifischen MMP-Inhibitoren anstatt des unspezifischen Aprotinin. Dieses wurde in dieser Arbeit verwendet, da es bereits im klinischen Alltag eingesetzt wurde. Allerdings ist Aprotinin nach drei Veröffentlichungen 2008 im New England Journal of Medicine in die Kritik geraten,

da eine erhöhte Mortalität bei Verwendung von Aprotinin bei Herzoperation gezeigt werden konnte [35;120;126], so dass die Firma Bayer Trasylol® vorläufig vom Markt zurückgezogen hat.

5.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit führten alle drei untersuchten Ablationsverfahren zu einer histologisch sichtbaren Destruktion des Tumorgewebes. Durch die Kryoablation entstand eine Kolliquationsnekrose, und es zeigte sich eine vermehrte Einblutung ins Gewebe, während es bei der Radiofrequenzablation und der Laserinduzierten Thermotherapie zu Koagulationsnekrosen kam. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum normalen Lebergewebe die Expression von MMP-2 und MMP-9 signifikant erhöht war. Nach Ablation der kolorektalen Lebermetastasen kam es nach der Kryoablation zu einer signifikanten Steigerung der MMP-2- und MMP-9-Expression. Dieser Effekt war in den anderen beiden Verfahren nicht so deutlich nachweisbar. Die MMP-Inhibition durch Aprotinin konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich zumindest in der Kryotherapiegruppe eine zum Teil verminderte MMP-2- und MMP-9-Expression. Zukünftige Studien sollten klären, ob eine Progredienz der MMP-Expression nach über sechs Stunden nach lokaler Tumorablation zu verzeichnen ist und ein spezifischer MMP-Inhibitor zu einer effektiveren Verringerung der entstandenen MMP-Aktivität führt.

Die Leberresektion bei kolorektalen Lebermetastasen bleibt Mittel der Wahl. Falls irresektable Metastasen bestehen, können lokal ablativ Verfahren eingesetzt werden, allerdings sind aufgrund der hier nachgewiesenen erhöhten MMP-Expression nach Kryoablation die hyperthermen Verfahren (RFA und LITT) der Kryotherapie vorzuziehen, um eine erhöhte Remetastasierungsrate zu vermeiden.

6 Literaturnachweise

1. Abdalla,E.K., R.Adam, A.J.Bilchik, D.Jaeck, J.N.Vauthey, D.Mahvi. 2006. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann. Surg. Oncol.* 13: 1271-1280.
2. Abdalla,E.K., J.N.Vauthey, L.M.Ellis, V.Ellis, R.Pollock, K.R.Broglio, K.Hess, S.A.Curley. 2004. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann. Surg.* 239: 818-825.
3. Adachi,Y., H.Yamamoto, F.Itoh, Y.Arimura, M.Nishi, T.Endo, K.Imai. 2001. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int. J. Cancer* 95: 290-294.
4. Adam,R., E.Avisar, A.Ariche, S.Giachetti, D.Azoulay, D.Castaing, F.Kunstlinger, F.Levi, F.Bismuth. 2001. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann. Surg. Oncol.* 8: 347-353.
5. Adam,R., A.Laurent, D.Azoulay, D.Castaing, H.Bismuth. 2000. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann. Surg.* 232: 777-785.
6. Al Asfoor,A., Z.Fedorowicz, M.Lodge. 2008. Resection versus no intervention or other surgical interventions for colorectal cancer liver metastases. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD006039.
7. Allan,J.A., A.J.Docherty, P.J.Barker, N.S.Huskinson, J.J.Reynolds, G.Murphy. 1995. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem. J.* 309 (Pt 1): 299-306.
8. Ambiru,S., M.Miyazaki, H.Ito, K.Nakagawa, H.Shimizu, Y.Nukui, S.Nozawa, A.Okuno, H.Yoshitomi, N.Nakajima. 1997. A prospective study of prognostic value of type IV collagenase activity in colorectal cancer tissue. *Dig. Dis. Sci.* 42: 1660-1665.
9. Anderson,C.D., W.C.Lin, J.Beckham, A.Mahadevan-Jansen, C.R.Buttemere, J.Pierce, I.B.Nicoud, P.C.Wright, R.S.Chari. 2004. Fluorescence spectroscopy accurately detects irreversible cell damage during hepatic radiofrequency ablation. *Surgery* 136: 524-531.

10. Baker,E.A., D.J.Leaper. 2002. Measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 28: 24-29.
11. Barry,M.A., C.A.Behnke, A.Eastman. 1990. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2353-2362.
12. Benndorf,R., H.Bielka. 1997. Cellular stress response: stress proteins--physiology and implications for cancer. *Recent Results Cancer Res.* 143: 129-144.
13. Bergers,G., R.Brekken, G.McMahon, T.H.Vu, T.Itoh, K.Tamaki, K.Tanzawa, P.Thorpe, S.Itohara, Z.Werb, D.Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2: 737-744.
14. Berton,A., S.Lorimier, H.Emonard, D.Laurent-Maquin, W.Hornebeck, G.Bellon. 2000. Contribution of the plasmin/matrix metalloproteinase cascade to the retraction of human fibroblast populated collagen lattices. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3: 173-180.
15. Bilchik,A.J., T.F.Wood, D.Allegra, G.J.Tsioulis, M.Chung, D.M.Rose, K.P.Ramming, D.L.Morton. 2000. Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasms: a proposed algorithm. *Arch. Surg.* 135: 657-662.
16. Bleicher,R.J., D.P.Allegra, D.T.Nora, T.F.Wood, L.J.Foshag, A.J.Bilchik. 2003. Radiofrequency ablation in 447 complex unresectable liver tumors: lessons learned. *Ann. Surg. Oncol.* 10: 52-58.
17. Choti,M.A., J.V.Sitzmann, M.F.Tiburi, W.Sumetchotimetha, R.Rangsin, R.D.Schulick, K.D.Lillemoe, C.J.Yeo, J.L.Cameron. 2002. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann. Surg.* 235: 759-766.
18. Christophi,C., M.Nikfarjam, C.Malcontenti-Wilson, V.Muralidharan. 2004. Long-term survival of patients with unresectable colorectal liver metastases treated by percutaneous interstitial laser thermotherapy. *World J. Surg.* 28: 987-994.

19. Chu,S.C., S.F.Yang, K.H.Lue, Y.S.Hsieh, C.L.Wu, K.H.Lu. 2004. Regulation of gelatinases expression by cytokines, endotoxin, and pharmacological agents in the human osteoarthritic knee. *Connect. Tissue Res.* 45: 142-150.
20. Chua,T.C., A.Saxena, F.Chu, J.Zhao, D.L.Morris. 2011. Predictors of cure after hepatic resection of colorectal liver metastases: an analysis of actual 5- and 10-year survivors. *J. Surg. Oncol.* 103: 796-800.
21. Chung,M.H., T.F.Wood, G.J.Tsioulis, D.M.Rose, A.J.Bilchik. 2001. Laparoscopic radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies. A phase 2 trial. *Surg. Endosc.* 15: 1020-1026.
22. Collen,A., R.Hanemaaijer, F.Lupu, P.H.Quax, N.van Lent, J.Grimbergen, E.Peters, P.Koolwijk, V.W.van Hinsbergh. 2003. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 101: 1810-1817.
23. Coussens,L.M., B.Fingleton, L.M.Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392.
24. Curley,S.A., F.Izzo, P.Delrio, L.M.Ellis, J.Granchi, P.Vallone, F.Fiore, S.Pignata, B.Daniele, F.Cremona. 1999. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann. Surg.* 230: 1-8.
25. Curley,S.A., P.Marra, K.Beatty, L.M.Ellis, J.N.Vauthey, E.K.Abdalla, C.Scaife, C.Raut, R.Wolff, H.Choi, E.Loyer, P.Vallone, F.Fiore, F.Scordino, R.De, V, R.Orlando, S.Pignata, B.Daniele, F.Izzo. 2004. Early and late complications after radiofrequency ablation of malignant liver tumors in 608 patients. *Ann. Surg.* 239: 450-458.
26. Davis,G.E., K.A.Pintar Allen, R.Salazar, S.A.Maxwell. 2001. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J. Cell Sci.* 114: 917-930.
27. De Baere,T., D.Elias, C.Dromain, M.G.Din, V.Kuoch, M.Ducieux, V.Boige, N.Lassau, V.Marteau, P.Lasser, A.Roche. 2000. Radiofrequency ablation of 100 hepatic metastases with a mean follow-up of more than 1 year. *AJR Am. J. Roentgenol.* 175: 1619-1625.

28. Dodd,G.D., III, M.C.Soulen, R.A.Kane, T.Livraghi, W.R.Lees, Y.Yamashita, A.R.Gillams, O.I.Karahan, H.Rhim. 2000. Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of a major breakthrough. *Radiographics* 20: 9-27.
29. Dragutinovic,V., L.Izrael-Zivkovic, N.Radovanovic. 2009. Relation of matrix metalloproteinase-9 to different stages of tumors in the serum of gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* 54: 1203-1207.
30. Eickmeyer,F., H.J.Schwarzmaier, F.P.Muller, Z.Nakic, Q.Yang, V.Fiedler. 2008. Survival after laser-induced interstitial thermotherapy of colorectal liver metastases--a comparison of first clinical experiences with current therapy results. *Rofo* 180: 35-41.
31. Elias,D., T.De Baere, T.Smayra, J.F.Ouellet, A.Roche, P.Lasser. 2002. Percutaneous radiofrequency thermoablation as an alternative to surgery for treatment of liver tumour recurrence after hepatectomy. *Br. J. Surg.* 89: 752-756.
32. Emara,M., P.Y.Cheung, K.Grabowski, G.Sawicki, M.Wozniak. 2009. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 and conventional tumor markers (CEA and CA 19-9) in patients with colorectal and gastric cancers. *Clin. Chem. Lab Med.* 47: 993-1000.
33. Fegiz,G., G.Ramacciato, L.Gennari, R.Doci, G.Pezzuoli, A.Leggeri, A.Peracchia, W.Montorsi, F.D'Angelo, P.Aurello. 1991. Hepatic resections for colorectal metastases: the Italian multicenter experience. *J. Surg. Oncol. Suppl* 2: 144-154.
34. Feliberti,E.C., L.D.Wagman. 2006. Radiofrequency ablation of liver metastases from colorectal carcinoma. *Cancer Control* 13: 48-51.
35. Fergusson,D.A., P.C.Hebert, C.D.Mazer, S.Fremes, C.MacAdams, J.M.Murkin, K.Teoh, P.C.Duke, R.Arellano, M.A.Blaichman, J.S.Bussieres, D.Cote, J.Karski, R.Martineau, J.A.Robblee, M.Rodger, G.Wells, J.Clinch, R.Pretorius. 2008. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N. Engl. J. Med.* 358: 2319-2331.
36. Fernandez,F.G., J.A.Drebin, D.C.Linehan, F.Dehdashti, B.A.Siegel, S.M.Strasberg. 2004. Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann. Surg.* 240: 438-447.

37. Fong,Y., J.Fortner, R.L.Sun, M.F.Brennan, L.H.Blumgart. 1999. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann. Surg.* 230: 309-318.
38. Fortner,J.G., Y.Fong. 2009. Twenty-five-year follow-up for liver resection: the personal series of Dr. Joseph G. Fortner. *Ann. Surg.* 250: 908-913.
39. Frich,L., K.Bjornland, S.Pettersen, O.P.Clausen, I.P.Gladhaug. 2006. Increased activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 after hepatic radiofrequency ablation. *J. Surg. Res.* 135: 297-304.
40. Fuhrman,G.M., S.A.Curley, D.C.Hohn, M.S.Roh. 1995. Improved survival after resection of colorectal liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 2: 537-541.
41. Gage,A.A., J.Baust. 1998. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology* 37: 171-186.
42. Garcea,G., N.Polemonivi, E.O'Leary, T.D.Lloyd, A.R.Dennison, D.P.Berry. 2004. Two-stage liver resection and chemotherapy for bilobar colorectal liver metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* 30: 759-764.
43. Gillams,A.R., W.R.Lees. 2000. Survival after percutaneous, image-guided, thermal ablation of hepatic metastases from colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 43: 656-661.
44. Gillams,A.R., W.R.Lees. 2004. Radio-frequency ablation of colorectal liver metastases in 167 patients. *Eur. Radiol.* 14: 2261-2267.
45. Gold,J.S., C.Are, P.Kornprat, W.R.Jarnagin, M.Gonen, Y.Fong, R.P.DeMatteo, L.H.Blumgart, M.D'Angelica. 2008. Increased use of parenchymal-sparing surgery for bilateral liver metastases from colorectal cancer is associated with improved mortality without change in oncologic outcome: trends in treatment over time in 440 patients. *Ann. Surg.* 247: 109-117.
46. Grundmann,R.T. 2011. Current state of surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. *World J. Gastrointest. Surg.* 3: 183-196.
47. Hewitt,P.M., S.J.Dwerryhouse, J.Zhao, D.L.Morris. 1998. Multiple bilobar liver metastases: cryotherapy for residual lesions after liver resection. *J. Surg. Oncol.* 67: 112-116.
48. Hidalgo,M., S.G.Eckhardt. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 178-193.

49. Hua,J., R.J.Muschel. 1996. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* 56: 5279-5284.
50. Hur,H., Y.T.Ko, B.S.Min, K.S.Kim, J.S.Choi, S.K.Sohn, C.H.Cho, H.K.Ko, J.T.Lee, N.K.Kim. 2009. Comparative study of resection and radiofrequency ablation in the treatment of solitary colorectal liver metastases. *Am. J. Surg.* 197: 728-736.
51. Jaeck,D., E.Oussoultzoglou, E.Rosso, M.Greget, J.C.Weber, P.Bachellier. 2004. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann. Surg.* 240: 1037-1049.
52. Jamison,R.L., J.H.Donohue, D.M.Nagorney, C.B.Rosen, W.S.Harmsen, D.M.Istrup. 1997. Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. *Arch. Surg.* 132: 505-510.
53. Jemal,A., R.Siegel, E.Ward, Y.Hao, J.Xu, M.J.Thun. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59: 225-249.
54. Junginger,T., J.K.Seifert, T.F.Weigel, A.Heintz, K.F.Kreitner, C.D.Gerharz. 1998. Cryotherapy of liver metastases. Initial results. *Med. Klin. (Munich)* 93: 517-523.
55. Karanjia,N.D., J.T.Lordan, N.Quiney, W.J.Fawcett, T.R.Worthington, J.Remington. 2009. A comparison of right and extended right hepatectomy with all other hepatic resections for colorectal liver metastases: a ten-year study. *Eur. J. Surg. Oncol.* 35: 65-70.
56. Kasper,H.U., C.Bangard, A.Gossmann, H.P.Dienes, D.L.Stippel. 2010. Pathomorphological changes after radiofrequency ablation in the liver. *Pathol. Int.* 60: 149-155.
57. Kato,T., K.Yasui, T.Hirai, Y.Kanemitsu, T.Mori, K.Sugihara, H.Mochizuki, J.Yamamoto. 2003. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Dis. Colon Rectum* 46: S22-S31.
58. Ke,S., X.M.Ding, J.Kong, J.Gao, S.H.Wang, Y.Cheng, W.B.Sun. 2010. Low temperature of radiofrequency ablation at the target sites can facilitate rapid progression of residual hepatic VX2 carcinoma. *J. Transl. Med.* 8: 73.

59. Kollmar,O., M.Corsten, C.Scheuer, B.Vollmar, M.K.Schilling, M.D.Menger. 2010. Tumour growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br. J. Surg.* 97: 917-926.
60. Kollmar,O., S.Richter, J.Czyborra, M.D.Menger, S.Dietrich, M.K.Schilling, C.M.Kirsch, G.A.Pistorius. 2004. Aprotinin inhibits local platelet trapping and improves tissue destruction in hepatic cryosurgery. *Surgery* 136: 624-632.
61. Kollmar,O., S.Richter, M.K.Schilling, M.D.Menger, G.A.Pistorius. 2004. Advanced hepatic tissue destruction in ablative cryosurgery: potentials of intermittent freezing and selective vascular inflow occlusion. *Cryobiology* 48: 263-272.
62. Kollmar,O., M.K.Schilling, M.D.Menger. 2004. Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 21: 453-460.
63. Kuhn,J.P., R.Puls, H.Wallaschowski, C.D.Heidecke, C.Rosenberg, N.Hosten. 2008. Characteristics of necrosis after laser-induced thermotherapy in contrast-enhanced MRI and implications for treatment success. *Rofo* 180: 816-820.
64. Lee,J.D., J.M.Lee, S.W.Kim, C.S.Kim, W.S.Mun. 2001. MR imaging-histopathologic correlation of radiofrequency thermal ablation lesion in a rabbit liver model: observation during acute and chronic stages. *Korean J. Radiol.* 2: 151-158.
65. Lencioni,R., L.Crocetti, D.Cioni, P.C.Della, C.Bartolozzi. 2004. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatic colorectal metastases: technique, indications, results, and new promises. *Invest Radiol.* 39: 689-697.
66. Lencioni,R., O.Goletti, N.Armillotta, A.Paolicchi, M.Moretti, D.Cioni, F.Donati, A.Cicorelli, S.Ricci, M.Carrai, P.F.Conte, E.Cavina, C.Bartolozzi. 1998. Radio-frequency thermal ablation of liver metastases with a cooled-tip electrode needle: results of a pilot clinical trial. *Eur. Radiol.* 8: 1205-1211.
67. Levy,A.T., V.Cioce, M.E.Sobel, S.Garbisa, W.F.Grigioni, L.A.Liotta, W.G.Stetler-Stevenson. 1991. Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51: 439-444.
68. Lewis,A.M., R.C.Martin. 2006. The treatment of hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Am. Surg.* 72: 466-473.

69. Li,L., S.Zhang, H.Lin, J.Y.Lin. 2002. Relationship of expression unbalance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase to invasiveness and metastasis in gastric carcinomas. *Ai. Zheng.* 21: 305-310.
70. Liabakk,N.B., I.Talbot, R.A.Smith, K.Wilkinson, F.Balkwill. 1996. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* 56: 190-196.
71. Liu,L.X., W.H.Zhang, H.C.Jiang. 2003. Current treatment for liver metastases from colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 9: 193-200.
72. Lowry,O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
73. Machi,J. 2001. Radiofrequency ablation for multiple hepatic metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 8: 379-380.
74. Mala,T., B.Edwin, O.Mathisen, T.Tillung, E.Fosse, A.Bergan, O.SOreide, I.Gladhaug. 2004. Cryoablation of colorectal liver metastases: minimally invasive tumour control. *Scand. J. Gastroenterol.* 39: 571-578.
75. Mazur,P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzeroTemperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol* 47: 347-369.
76. Mazur,P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
77. Mazur,P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol* 247: C125-C142.
78. Mc,D.S., V.Chaudhry, J.Mansilla-Soto, Z.S.Zeng, W.P.Shu, J.G.Guillem. 1999. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* 17: 341-349.
79. McGahan,J.P., P.D.Browning, J.M.Brock, H.Tesluk. 1990. Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery. *Invest Radiol.* 25: 267-270.
80. McKay,A., K.Fradette, J.Lipschitz. 2009. Long-term outcomes following hepatic resection and radiofrequency ablation of colorectal liver metastases. *HPB Surg.* 2009: 346863.
81. McLoughlin,J.M., E.H.Jensen, M.Malafa. 2006. Resection of colorectal liver metastases: current perspectives. *Cancer Control* 13: 32-41.
82. McMillan,D.C., C.S.McArdle. 2007. Epidemiology of colorectal liver metastases. *Surg. Oncol.* 16: 3-5.

83. Meijer,S., M.A.Paul, M.A.Cuesta, J.Blomjous. 1995. Intra-operative ultrasound in detection of liver metastases. *Eur. J. Cancer* 31A: 1210-1211.
84. Meryman,H.T. 1966. The interpretation of freezing rates in biological materials. *Cryobiology* 2: 165-170.
85. Minagawa,M., M.Makuuchi, G.Torzilli, T.Takayama, S.Kawasaki, T.Kosuge, J.Yamamoto, H.Imamura. 2000. Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. *Ann. Surg.* 231: 487-499.
86. Morimoto,M., K.Sugimori, K.Shirato, A.Kokawa, N.Tomita, T.Saito, N.Tanaka, A.Nozawa, M.Hara, H.Sekihara, H.Shimada, T.Imada, K.Tanaka. 2002. Treatment of hepatocellular carcinoma with radiofrequency ablation: radiologic-histologic correlation during follow-up periods. *Hepatology* 35: 1467-1475.
87. Morris,D.L., M.D.Horton, A.V.Dilley, A.Warlters, P.R.Clingan. 1993. Treatment of hepatic metastases by cryotherapy and regional cytotoxic perfusion. *Gut* 34: 1156-1157.
88. Nelson,A.R., B.Fingleton, M.L.Rothenberg, L.M.Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 18: 1135-1149.
89. Nikfarjam,M., C.Malcontenti-Wilson, C.Christophi. 2005. Focal hyperthermia produces progressive tumor necrosis independent of the initial thermal effects. *J. Gastrointest. Surg.* 9: 410-417.
90. Nikfarjam,M., V.Muralidharan, C.Christophi. 2005. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J. Surg. Res.* 127: 208-223.
91. Nikfarjam,M., V.Muralidharan, C.Malcontenti-Wilson, W.McLaren, C.Christophi. 2006. Impact of blood flow occlusion on liver necrosis following thermal ablation. *ANZ. J. Surg.* 76: 84-91.
92. Nolsoe,C.P., S.Torp-Pedersen, F.Burcharth, T.Horn, S.Pedersen, N.E.Christensen, E.S.Olldag, P.H.Andersen, S.Karstrup, T.Lorentzen. 1993. Interstitial hyperthermia of colorectal liver metastases with a US-guided Nd-YAG laser with a diffuser tip: a pilot clinical study. *Radiology* 187: 333-337.

93. Nordlinger,B., M.Guiguet, J.C.Vaillant, P.Balladur, K.Boudjema, P.Bachellier, D.Jaeck. 1996. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. *Cancer* 77: 1254-1262.
94. Oberg,A., M.Hoyhtya, B.Tavelin, R.Stenling, G.Lindmark. 2000. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 20: 1085-1091.
95. Onik,G.M., D.Atkinson, R.Zemel, M.L.Weaver. 1993. Cryosurgery of liver cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 9: 309-317.
96. Oshowo,A., A.Gillams, E.Harrison, W.R.Lees, I.Taylor. 2003. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* 90: 1240-1243.
97. Otto,G., C.Duber, M.Hoppe-Lotichius, J.Konig, M.Heise, M.B.Pitton. 2010. Radiofrequency ablation as first-line treatment in patients with early colorectal liver metastases amenable to surgery. *Ann. Surg.* 251: 796-803.
98. Parks,W.C., C.L.Wilson, Y.S.Lopez-Boado. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617-629.
99. Parsons,S.L., S.A.Watson, H.M.Collins, N.R.Griffin, P.A.Clark, R.J.Steele. 1998. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br. J. Cancer* 78: 1495-1502.
100. Paschos,K.A., N.Bird. 2008. Current diagnostic and therapeutic approaches for colorectal cancer liver metastasis. *Hippokratia.* 12: 132-138.
101. Pawlik,T.M., M.A.Choti. 2007. Surgical therapy for colorectal metastases to the liver. *J. Gastrointest. Surg.* 11: 1057-1077.
102. Pearson,A.S., F.Izzo, R.Y.Fleming, L.M.Ellis, P.Delrio, M.S.Roh, J.Granchi, S.A.Curley. 1999. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am. J. Surg.* 178: 592-599.
103. Pegg,D.E. 1987. Mechanisms of freezing damage. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41: 363-378.
104. Pereira,P.L., S.Clasen, A.Boss, D.Schmidt, C.Gouttefangeas, C.Burkart, J.Wiskirchen, G.Tepe, C.D.Claussen. 2004. Radiofrequency ablation of liver metastases. *Radiologe* 44: 347-357.

105. Pietruska,M., J.Pietruski, A.Skurska, A.Bernaczyk, J.Zak, B.Zelazowska, E.Dolinska, A.Paniczko-Drezek, J.Wysocka. 2009. Assessment of aprotinin influence on periodontal clinical status and matrix metalloproteinases 1, 2 and their tissue inhibitors saliva concentrations in patients with chronic periodontitis. *Adv. Med. Sci.* 54: 239-246.
106. Poston,G.J., R.Adam, S.Alberts, S.Curley, J.Figueras, D.Haller, F.Kunstlinger, G.Mentha, B.Nordlinger, Y.Patt, J.Primrose, M.Roh, P.Rougier, T.Ruers, H.J.Schmoll, C.Valls, N.J.Vauthey, M.Cornelis, J.P.Kahan. 2005. OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 23: 7125-7134.
107. Rai,R., C.Richardson, P.Flecknell, H.Robertson, A.Burt, D.M.Manas. 2005. Study of apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in hepatocytes following radiofrequency ablation (RFA). *J. Surg. Res.* 129: 147-151.
108. Ravikumar,T.S., R.Kane, B.Cady, R.Jenkins, M.Clouse, G.Steele, Jr. 1991. A 5-year study of cryosurgery in the treatment of liver tumors. *Arch. Surg.* 126: 1520-1523.
109. Reinacher-Schick,A.C., W.O.Bechstein. 2007. Colorectal liver metastases. Neoadjuvant chemotherapy: aspects of medical and surgical oncology. *Internist (Berl)* 48: 51-58.
110. Rivoire,M.L., E.J.Voiglio, P.Kaemmerlen, G.Molina, I.Treilleux, J.Finzy, E.Delay, F.Gory. 1996. Hepatic cryosurgery precision: evaluation of ultrasonography, thermometry, and impedancemetry in a pig model. *J. Surg. Oncol.* 61: 242-248.
111. Roeb,E., C.G.Dietrich, R.Winograd, M.Arndt, B.Breuer, J.Fass, V.Schumpelick, S.Matern. 2001. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 92: 2680-2691.
112. Roeb,E., S.Matern. 2003. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med. Klin. (Munich)* 98: 763-770.
113. Rossi,S., E.Buscarini, F.Garbagnati, M.Di Stasi, P.Quaretti, M.Rago, A.Zangrandi, S.Andreola, D.Silverman, L.Buscarini. 1998. Percutaneous treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode. *AJR Am. J. Roentgenol.* 170: 1015-1022.

114. Rossi,S., F.Fornari, C.Pathies, L.Buscarini. 1990. Thermal lesions induced by 480 KHz localized current field in guinea pig and pig liver. *Tumori* 76: 54-57.
115. Roy,S., K.Samanta, T.Chakraborti, A.Chowdhury, S.Chakraborti. 2011. Role of TGF-beta1 and TNF-alpha in IL-1beta mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: involvement of an aprotinin sensitive protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 513: 61-69.
116. Ruers,T.J., J.Joosten, G.J.Jager, T.Wobbes. 2001. Long-term results of treating hepatic colorectal metastases with cryosurgery. *Br. J. Surg.* 88: 844-849.
117. Sarpel,U., A.S.Bonavia, A.Grucela, S.Roayaie, M.E.Schwartz, D.M.Labow. 2009. Does anatomic versus nonanatomic resection affect recurrence and survival in patients undergoing surgery for colorectal liver metastasis? *Ann. Surg. Oncol.* 16: 379-384.
118. Scheele,J., R.Stang, A.Altendorf-Hofmann, M.Paul. 1995. Resection of colorectal liver metastases. *World J. Surg.* 19: 59-71.
119. Schiffman,S.C., M.Bower, R.E.Brown, R.C.Martin, K.M.McMasters, C.R.Scoggins. 2010. Hepatectomy is superior to thermal ablation for patients with a solitary colorectal liver metastasis. *J. Gastrointest. Surg.* 14: 1881-1886.
120. Schneeweiss,S., J.D.Seeger, J.Landon, A.M.Walker. 2008. Aprotinin during coronary-artery bypass grafting and risk of death. *N. Engl. J. Med.* 358: 771-783.
121. Seeland,U., S.Selejan, S.Engelhardt, P.Muller, M.J.Lohse, M.Bohm. 2007. Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic Res. Cardiol.* 102: 183-193.
122. Seifert,J.K., T.Achenbach, A.Heintz, T.C.Bottger, T.Junginger. 2000. Cryotherapy for liver metastases. *Int. J. Colorectal Dis.* 15: 161-166.
123. Seifert,J.K., A.Heintz, T.Junginger. 2002. Cryotherapy for primary and secondary liver tumours. *Zentralbl. Chir* 127: 275-281.
124. Seifert,J.K., T.Junginger. 2004. Cryotherapy for liver tumors: current status, perspectives, clinical results, and review of literature. *Technol. Cancer Res. Treat.* 3: 151-163.
125. Seifert,J.K., D.L.Morris. 1998. Prognostic factors after cryotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer. *Ann. Surg.* 228: 201-208.

126. Shaw,A.D., M.Stafford-Smith, W.D.White, B.Phillips-Bute, M.Swaminathan, C.Milano, I.J.Welsby, S.Aronson, J.P.Mathew, E.D.Peterson, M.F.Newman. 2008. The effect of aprotinin on outcome after coronary-artery bypass grafting. *N. Engl. J. Med.* 358: 784-793.
127. Sherman,J.K. 1962. Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. *Anat. Rec.* 144: 171-189.
128. Siperstein,A., A.Garland, K.Engle, S.Rogers, E.Berber, A.Foroutani, A.String, T.Ryan, P.Ituarte. 2000. Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors. *Ann. Surg. Oncol.* 7: 106-113.
129. Siperstein,A.E., E.Berber, N.Ballem, R.T.Parikh. 2007. Survival after radiofrequency ablation of colorectal liver metastases: 10-year experience. *Ann. Surg.* 246: 559-565.
130. Solbiati,L., T.Ierace, S.N.Goldberg, S.Sironi, T.Livraghi, R.Fiocca, G.Servadio, G.Rizzatto, P.R.Mueller, A.Del Maschio, G.S.Gazelle. 1997. Percutaneous US-guided radio-frequency tissue ablation of liver metastases: treatment and follow-up in 16 patients. *Radiology* 202: 195-203.
131. Solbiati,L., T.Livraghi, S.N.Goldberg, T.Ierace, F.Meloni, M.Dellanoce, L.Cova, E.F.Halpern, G.S.Gazelle. 2001. Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients. *Radiology* 221: 159-166.
132. Sugimori,K., M.Morimoto, K.Shirato, A.Kokawa, N.Tomita, T.Saito, A.Nozawa, M.Hara, H.Sekihara, K.Tanaka. 2002. Radiofrequency ablation in a pig liver model: effect of transcatheter arterial embolization on coagulation diameter and histologic characteristics. *Hepatol. Res.* 24: 164.
133. Tacke,J., A.Mahnken, A.Roggan, R.W.Gunther. 2004. Multipolar radiofrequency ablation: first clinical results. *Rofo* 176: 324-329.
134. Tamaki,K., I.Shimizu, A.Oshio, H.Fukuno, H.Inoue, A.Tsutsui, H.Shibata, N.Sano, S.Ito. 2004. Influence of large intrahepatic blood vessels on the gross and histological characteristics of lesions produced by radiofrequency ablation in a pig liver model. *Liver Int.* 24: 696-701.
135. Tranberg,K.G., P.H.Moller, P.Hannesson, U.Stenram. 1996. Interstitial laser treatment of malignant tumours: initial experience. *Eur. J. Surg. Oncol.* 22: 47-54.

136. Vanagas,T., A.Gulbinas, J.Pundzius, G.Barauskas. 2010. Radiofrequency ablation of liver tumors (II): clinical application and outcomes. *Medicina (Kaunas.)* 46: 81-88.
137. Vanagas,T., A.Gulbinas, I.Sadauskiene, Z.Dambrauskas, J.Pundzius, G.Barauskas. 2009. Apoptosis is activated in an early period after radiofrequency ablation of liver tissue. *Hepatogastroenterology* 56: 1095-1099.
138. Vauthey,J.N., M.A.Choti, W.S.Helton. 2006. AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on hepatic colorectal metastases: rationale and overview of the conference. January 25, 2006. *Ann. Surg. Oncol.* 13: 1259-1260.
139. Vogl,T., M.Mack, R.Straub, S.Zangos, D.Woitaschek, K.Eichler, K.Engelmann. 2001. Thermal ablation of liver metastases. Current status and prospects. *Radiologe* 41: 49-55.
140. von Heesen,M., J.Schuld, J.Sperling, F.Grunhage, F.Lammert, S.Richter, M.K.Schilling, O.Kollmar. 2011. Parenchyma-preserving hepatic resection for colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch. Surg.*
141. Waas,E.T., R.M.Lomme, J.DeGroot, T.Wobbes, T.Hendriks. 2002. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 86: 1876-1883.
142. Waas,E.T., T.Wobbes, R.M.Lomme, J.DeGroot, T.Ruers, T.Hendriks. 2003. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Br. J. Surg.* 90: 1556-1564.
143. Wagenaar-Miller,R.A., L.Gorden, L.M.Matrisian. 2004. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev.* 23: 119-135.
144. Wagner,J.S., M.A.Adson, J.A.Van Heerden, M.H.Adson, D.M.Illstrup. 1984. The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. *Ann. Surg.* 199: 502-508.
145. Weaver,M.L., D.Atkinson, R.Zemel. 1995. Hepatic cryosurgery in treating colorectal metastases. *Cancer* 76: 210-214.
146. Weitz,J., M.Koch, J.Debus, T.Hohler, P.R.Galle, M.W.Buchler. 2005. Colorectal cancer. *Lancet* 365: 153-165.
147. Westermarck,J., V.M.Kahari. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13: 781-792.

148. Xu,K.C., L.Z.Niu, W.B.He, Z.Q.Guo, Y.Z.Hu, J.S.Zuo. 2003. Percutaneous cryoablation in combination with ethanol injection for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 9: 2686-2689.
149. Yoon,S.S., K.K.Tanabe. 1999. Surgical treatment and other regional treatments for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist.* 4: 197-208.
150. Zeng,Z.S., J.G.Guillem. 1995. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br. J. Cancer* 72: 575-582.
151. Zeng,Z.S., Y.Huang, A.M.Cohen, J.G.Guillem. 1996. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J. Clin. Oncol.* 14: 3133-3140.
152. Zhang,S., L.Li, J.Y.Lin, H.Lin. 2003. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 9: 899-904.
153. Zhou,Z.G., X.J.Wu, L.R.Li, Z.H.Peng, P.R.Ding, R.J.Wang, Z.Z.Pan. 2011. A multivariate analysis of prognostic determinants for stages II and III colorectal cancer in 141 patients. *Chin Med. J. (Engl.)* 124: 2132-2135.

7 Publikationen

Publikationen zu dieser Arbeit:

Gesteigerte Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 nach Kryotherapie und Radiofrequenzablation von kolorektalen Lebermetastasen

L. Oberkircher, U. Seeland, S. Richter, C. Scheuer, M.K. Schilling, O. Kollmar

Chirurgisches Forum 2008, Volume 37, IV., 65-66

Evidence for tumor cell spread during cryosurgery for colorectal cancer liver metastases – clinical and experimental data

J. Schuld, S. Richter, L. Oberkircher, U. Seeland, K. Debnar-Daumler, S. N. Sauer, J. Rauch, M. D. Menger, M. K. Schilling, O. Kollmar

Journal of Surgical Research, in Review

Vortrag zu dieser Arbeit:

Gesteigerte Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 nach Kryotherapie und Radiofrequenzablation von kolorektalen Lebermetastasen

L. Oberkircher, U. Seeland, S. Richter, C. Scheuer, M.K. Schilling, O. Kollmar

23.04.2008, Chirurgisches Forum, 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 22.04.-25.04.2008, Berlin

Sonstige Publikationen / publizierte Abstracts:

Cement Interdigitation and Bone-Cement Interface after augmentation of vertebral compression fractures – a cadaver study

L. Oberkircher, A. Krueger, C. Bliemel, M. Kratz, S. Ruchholtz

Abstract V 53, European Spine Journal 2010 19:1984

Incidence for pulmonary cement embolism following percutaneous kyphoplasty.

Clinical results after 1,5 years

C. Bliemel, A. Krueger, L. Oberkircher, S. Ruchholtz

Abstract P 51, European Spine Journal 2010 19:2018

Higher incidence for adjacent vertebral fractures following percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty – Fact or fiction?

A. Krueger, C. Bliemel, L. Oberkircher, S. Ruchholtz

Abstract P 55, European Spine Journal 2010 19:2019

Zementinterdigitation und Knochen-Zement Interface unterschiedlicher Wirbelkörperaugmentationsverfahren. Eine Kadaverstudie.

Oberkircher L, Krueger A, Bliemel C, Kratz M, Flossdorf F, Ruchholtz S.

Osteoporose & Rheuma aktuell 1 / 2011; 12-14

Präklinische Schmerzen und Analgetikatherapie von geriatrischen Patienten mit proximaler Femurfraktur

L. Oberkircher, B. Bücking, S. Strüwer, N. Schubert, E. Ziring, S. Ruchholtz

MedReport 33/35. Jahrgang 2011; 9

Biomechanical comparison of the Screw position for internal Fixation of Type II Dens Fractures

L. Oberkircher, A. Krueger, C. Bliemel, F. Flossdorf, S. Ruchholtz

Abstract V 15, European Spine Journal 2011 20:1985

Differences in height restoration after treating osteoporotic vertebral compression fractures – a cadaveric study

A. Krueger, L. Oberkircher, F. Flossdorf, F. Bolzinger, J.-F. Oglaza, I. Moberg, S. Ruchholtz

Abstract P94, European Spine Journal 2011 20:2049

Biomechanical evaluation of two different insertion points for ventral screw fixation of fractures of the dens axis (C2)

L. Oberkircher, C. Bliemel, F. Flossdorf, T. Müller, S. Ruchholtz, A. Krueger

Spine Journal, in Review

Height restoration of osteoporotic vertebral compression fractures using different intravertebral reduction devices: a cadaveric study

A. Krueger, L. Oberkircher, J. Figiel, F. Flossdorf, F. Bolzinger, D. C. Noriega, S. Ruchholtz

Spine Journal, in Review

Ausgewählte Vorträge:

Cement Interdigitation and Bone Cement Interface

L. Oberkircher, A. Krueger, C. Bliemel, M. Kratz, S. Ruchholtz

02.06.2010, 2nd WCMISS (World Congress of Minimally Invasive Spine Surgery and Techniques), 01.-04.2010, Las Vegas

Zementinterdigitation und Knochen-Zement Interface unterschiedlicher

Wirbelkörperaugmentationsverfahren – eine Kadaverstudie

L. Oberkircher, A. Krueger, C. Bliemel, M. Kratz, S. Ruchholtz

17.12.2010, 5. Deutscher Wirbelsäulenkongress, 16.-18.12.2010, Bremen

Präklinische Schmerzen und Analgetikatherapie von geriatrischen Patienten mit proximaler Femurfraktur

L. Oberkircher, B. Bücking, S. Strüwer, N. Schubert, E. Ziring, S. Ruchholtz

28.10.2011, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 25.-28.10.2011, Berlin

Biomechanische Untersuchung zu unterschiedlichen Insertionspunkten bei der ventralen Verschraubung von Dens axis Frakturen

L. Oberkircher, A. Krueger, C. Bliemel, F. Flossdorf, S. Ruchholtz

08.12.2011, 6. Deutscher Wirbelsäulenkongress, 08-10.12.2011, Hamburg

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung. Er war zu jeder Zeit bereit, bei allen relevanten Dingen, wie z.B. Organisation und Auswertung, zur Hilfe zu stehen. Außerdem bedanke ich mich für die Korrektur, die konstruktiven Diskussionen, Kritiken und die motivierende Unterstützung.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für viele Hilfestellungen und die zu Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Michael Böhm für die zu Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte im Labor der Kardiologie danken. Allen dortigen Mitarbeiter danke ich für die tolle Unterstützung, insbesondere Frau Dr. Ute Seeland, die mir mit viel Geduld die Methode der Zymographie nahe gebracht hat und stets für konstruktive Gespräche bereit war. Meiner Mitdotorandin, Dr. Katharina Debnar-Daumler, danke ich für die Einführung in die Operationstechniken und das Erlernen der Gerätefunktionen. Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanken. Hervorzuheben sind dabei Janine Becker für die Aufbereitung der Histologie, Frau Elisabeth Gluding für ihre tatkräftige Unterstützung und Frau Dr. Claudia Scheuer für ihre Hilfe bei der Auswertung der Zymographien. Allen danke ich für die tolle und freundschaftliche Atmosphäre und die moralische Unterstützung.

Mein großer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Barbara Huber, die mich immer wieder motiviert hat und mir jederzeit liebevoll zur Seite gestanden ist.

Allen meinen Freunden, insbesondere Gregg Frost, und den Kollegen der Unfallchirurgie an der Universitätsklinik Marburg, die mich auch in schwierigen Phasen immer wieder motiviert und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Zum Schluss gehört ein besonderer Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne deren Motivation und Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums diese Dissertation sicher nicht möglich gewesen wäre. Meiner Mutter danke ich darüber hinaus für die Korrektur der Rechtschreibung und Grammatik.

9 Lebenslauf

Persönliches:

Name: Ludwig Walter Waldemar Oberkircher
Geburtsdatum: 20.06.1980 in Neunkirchen/Saar
Wohnort: Biegenstr. 55, 35037 Marburg
Nationalität: Deutsch
Konfession: Evangelisch
Eltern: Ingeborg Oberkircher (Studienrätin i.R.),
Dieter Oberkircher (Dekan i.R.)
Geschwister: Dorothea Oberkircher und Leonore Oberkircher

Schulische Ausbildung:

1986-1990: Grundschule Winnweiler
1990-1997: Wilhelm-Erb-Gymnasium Winnweiler
1997-1999: Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken

Berufliche Ausbildung:

ab WS 00/01: Studium im Fach Medizin an der Universitätsklinik Homburg/Saar
2007 - 2008: Praktisches Jahr:
1. Tertial (09/07-12/07): Anästhesie an der Universitätsklinik
Homburg/Saar im Bereich Intensivmedizin und OP-Anästhesie
(Prof. Dr. Larsen)
2. Tertial (01/08-03/08): Innere Medizin an der Universitätsklinik
Homburg/Saar in den Abteilungen für Pulmologie (Prof. Dr.
Sybrecht) und Nephrologie (Prof. Dr. Flieser)
3. Tertial (04/08-07/08): Chirurgie am Spital Zollikerberg, Zürich
(Dr. Müller)
November 2008: Abschluss des Studiums mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung
seit Mai 2009: Assistenzarzt am Universitätsklinikum Marburg in der Abteilung für
Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie

Sonstige Ausbildung:

1992-1999: Ausbildung als Organist und Chorleiter in der Evang. Kirche der
Pfalz mit Abschluss der C-Prüfung

Weitere Tätigkeiten:

1992 - 2008: Organist der Evang. Kirche der Pfalz
1998 - 2008: Medikamentenbringdienst bei der Schloss Apotheke Zweibrücken
1999-2000: Ersatzdienst im Evang. Krankenhaus Zweibrücken
2001-2003: Chorleiter des Evang. Kirchenchores Zweibrücken-
Niederauerbach